

**WECHSELWIRKUNG LÖSLICHER ENZYME
MIT LIPIDSUBSTRATEN AM BEISPIEL
DES GANGLIOSID_{M2}-ABBAUS DURCH HEXOSAMINIDASEN
AUFKLÄRUNG EINER LIPID-SPEICHERKRANKHEIT
ALS FOLGE EINES AKTIVATOR-DEFEKTS**

Ernst Conzelmann

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0028

WECHSELWIRKUNG LÖSLICHER ENZYME MIT LIPIDSUBSTRATEN
AM BEISPIEL DES GANGLIOSID G_{M2} -ABBAUS DURCH HEXOSAMINIDASEN
AUFKLÄRUNG EINER LIPID-SPEICHERKRANKHEIT ALS FOLGE
EINES AKTIVATOR-DEFEKTS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ernst Conzelmann
aus
München

München 1979

1. Berichterstatter : Prof. Dr. K. Sandhoff
2. Berichterstatter : Prof. Dr. F. Lynen

Tag der Einreichung : 13. Juni 1979
Tag der mündlichen Prüfung : 26. Juli 1979



Herrn Prof. Dr. Sandhoff bin ich für die Anregung
zu dieser Arbeit, sowie für seine stetige Förderung und
zahlreiche kritische Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Die Detergensabhängigkeit des in-vitro-Abbaus der Glykosphingolipide G_{M2} und G_{A2} durch Hexosaminidasen	8
2.1. Einführende Bemerkungen	8
2.2. Der Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die Hexosaminidase A in Gegenwart von Detergentien	9
2.2.1. Vergleich verschiedener Detergentien	11
2.2.2. Einfluß des Detergens auf den Abbau wasserlöslicher Substrate	13
2.2.3. Zeitabhängigkeit der enzymatischen Reaktion unter dem Einfluß von Detergentien	15
2.2.4. Einfluß der Ionenstärke	20
2.2.5. Protein-Abhängigkeit	20
2.2.6. Einfluß der Substratkonzentration	20
2.2.7. Zusammenfassung der Versuche zum Einfluß der Detergentien auf die enzymatische Gangliosid-Spaltung	25
2.3. Substratspezifität der Isoenzyme in Gegenwart von Taurodesoxycholat	26
3. Isolierung und Charakterisierung des Aktivatorproteins für den Abbau von Sphingolipiden durch Hexosaminidase A	29
3.1. Bereits bekannte Aktivatorproteine für andere am Glykolipidabbau beteiligte lyosomale Enzyme	29
3.2. Nachweis und Reinigung des Aktivators für die enzymatische Spaltung der Glykolipide G_{M2} und G_{A2}	30
3.2.1. Nachweis in Extrakten verschiedener Gewebe	30
3.2.2. Hitzebehandlung der Extrakte	30

	Seite
3.2.3. Säurefällung	32
3.2.4. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose	34
3.2.5. Gelfiltration an Bio-Gel P 200 - scheinbare Auftrennung des Aktivators in zwei Komponenten	34
3.2.6. Untersuchungen zur Funktion der höher- molekularen Komponente	37
3.2.7. Weitere Reinigung des eigentlichen Aktivatorproteins durch präparative Elektrophorese mit anschließender isoelektrischer Fokussierung	39
3.2.8. Hydrophobe Chromatographie an Octyl- Sepharose	42
3.2.9. Bilanz der Anreicherung	49
3.3. Charakterisierung des Aktivators	49
3.3.1. Abbau durch Pronase P	49
3.3.2. Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration	49
3.3.3. Isoelektrischer Punkt	52
3.3.4. Isoenzym- und Substratspezifität	52
3.3.5. pH-Optimum	55
3.3.6. Kinetiken	55
3.3.7. Nachweis des Substrat-Aktivator- Komplexes	64
3.3.8. Zusammenfassung	65
4. Die Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose	68
4.1. Die Varianten der infantilen G_{M2} -Ganglio- sidose	68
4.2. Nachweis des Aktivatordefekts bei einem Fall der Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose	70
4.3. Nachweis des Aktivatordefekts in kultivierten Hautfibroblasten eines weiteren Falls der Variante AB	74

	Seite
5. Diskussion	78
6. Material und Methoden	92
6.1. Materialien	92
6.1.1. Chemikalien	92
6.1.2. Gewebe und Zellen	93
6.1.3. Andere Aktivatorproteine	94
6.2. Methoden	94
6.2.1. Radioaktive Markierung des Gangliosids G_{M2}	94
6.2.2. Messung der Hexosaminidase-Aktivität	95
6.2.2.1. Synthetisches Substrat	
6.2.2.2. Gangliosid G_{M2}	
6.2.2.3. Glykolipid G_{A2} und Nierenglobosid	
6.2.2.4. Bestimmung des Aktivatorgehalts	
6.2.3. Enzym-Isolierung	97
6.2.4. Aktivator-Anreicherung	99
6.2.4.1. Homogenate und Extrakte	
6.2.4.2. Hitzebehandlung und Säurefällung	
6.2.4.3. Ionenaustauschchromatographie	
6.2.4.4. Gelfiltration an Bio-Gel P 200	
6.2.4.5. Präparative Elektrophorese	
6.2.4.6. Präparative isoelektr. Fokussierung	
6.2.4.7. Hydrophobe Chromatographie	
6.2.5. Protein-Messung	103
6.2.6. Charakterisierung des Aktivators	103
6.2.6.1. Proteolytischer Abbau	
6.2.6.2. Hitzestabilität	
6.2.6.3. Molekulargewichtsbestimmung	
6.2.7. Analytische Elektrophoresen	104
6.2.8. Isoelektr. Fokussierung im Dichte-Gradienten	106
6.2.9. Messung der kritischen Mizellkonzentration	106
6.2.10. Zellzüchtung	107
	108

	Seite
7. Literatur	108
8. Anhang - Ableitung der verwendeten Gleichungen	114
8.1. Gleichungen für die Zeitabhängigkeit der Produktbildung bei gleichzeitiger Inakti- vierung des Enzyms	114
8.2. Gleichungen für die Kinetik des enzymatischen Lipidabbaus in Gegenwart des Aktivator- proteins	116
9. Zusammenfassung	119
Lebenslauf	122

Verzeichnis der Abkürzungen :

a) Sphingolipide

Gangliosid G_{M2} = GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal(3 $\leftarrow$ 2~~NeuAc~~) β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1Cer

Glykolipid G_{A2} = GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1Cer

Nierenglobosid = GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1Cer

Cer = Ceramid = N-Acylsphingosin (vgl. Abb. 1)

b) Zucker

Glc = D-Glukose

Gal = D-Galaktose

GalNAc = 2-Acetamido-2-desoxy-D-galaktose

NeuAc = N-Acetylneuraminsäure

c) Detergentien

TC = Taurocholat

TDC = Taurodesoxycholat

TChDC = Taurochenodesoxycholat

GDC = Glykodesoxycholat

GChDC = Glykochenodesoxycholat

TX-100 = Triton X-100

d) Enzyme

Hex A = Hexosaminidase A

Hex B = " B

Hex S = " S

U = Unit = Enzymeinheit (zur Def. s. Material
und Methoden)

e) Sonstige

MUF = 4-Methylumbelliferon

MUFGlcNAc = 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-
 β -D-glukopyranosid

CMC = Kritische Mizellkonzentration

RSA = Rinderserumalbumin

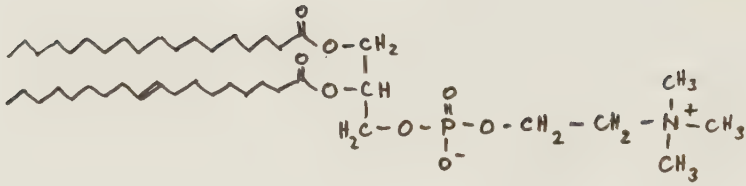
^3H = Tritium

1. Einleitung und Zielsetzung

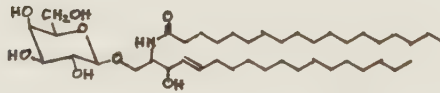
Das große Interesse, das dem Stoffwechsel komplexer Lipide in steigendem Maße entgegengebracht wird, beruht hauptsächlich auf der Bedeutung dieser Stoffklasse als Bausteine biologischer Membranen. Lipide bestimmen nicht nur aufgrund ihres amphiphilen Charakters das physikochemische Verhalten von Membranen, sie sind auch Voraussetzung für die Aktivität membrangebundener Enzyme, teils weil diese Enzyme ganz allgemein als amphipathische Proteine eine hydrophobe Umgebung benötigen, zum Teil auch als Modulatoren von Enzymen mit ausgeprägter Lipid-Spezifität (vgl. Gazzotti und Peterson, 1977; Sandermann, 1978).

Quantitativ die größte Bedeutung besitzen dabei die Phospholipide (Abb. 1a), die in unterschiedlicher Verteilung in allen biologischen Membranen vorkommen. Hingegen werden die Glykosphingolipide in wesentlich geringerer Menge und nur in der äußeren Hälfte der Plasmamembran gefunden (Renkonen et al., 1972; Hakomori, 1975). Strukturell leiten sie sich vom Ceramid, dem N-Acyl-Derivat des Aminoalkohols Sphingosin (Abb. 1b) ab, an dessen primärer Hydroxyl-Gruppe einzelne Zucker- oder Oligosaccharid-Reste β -glykosidisch gebunden sind.

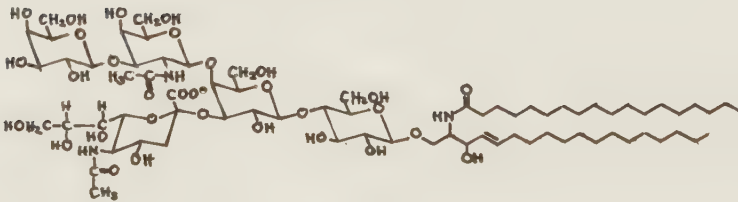
Über ihre biologische Funktion ist bisher wenig Sicheres bekannt, ihr Kohlenhydratanteil scheint jedoch - zusammen mit dem der Glykoproteine - einen wichtigen Beitrag zur Oberflächenstruktur der Zellen zu liefern. So besitzen einige Glykosphingolipide die antigenen Eigenschaften von Blutgruppen-Substanzen (z.B. Dejter-Juszynski et al., 1978), andere, speziell Ganglioside, dienen als Rezeptoren für eine Reihe von Toxinen wie Choleratoxin (King und van Heyningen, 1973; Holmgren et al., 1973), Enterotoxin (Holmgren, 1973) und wahrscheinlich auch Tetanustoxin (van Heyningen, 1976; Koschine, 1977), aber auch für körpereigene Substanzen wie Interferon (Besancon und Ankel, 1974; Besancon et al., 1976; Vengris et al., 1976; Kuwata et al., 1978) und Thyreotropin (Mullin et al., 1976) (vgl. z.B. Fishman und Brady, 1976; Yamakawa und Nagai, 1978). Roseman vermutet auch, daß die Glykosphingolipide für die gegenseitige Erkennung und Adhäsion von Zellen eine Rolle spielen (Roseman, 1970), eine Auffassung, für die inzwischen weitere Evidenzen gesichert



a) Phosphoglycerolipid (Phosphatidylcholin, Lecithin)



b) Glykosphingolipid (Galaktocerebrosid)



c) Gangliosid (G_{M1})

Abbildung 1: Strukturen einiger Lipide
(b) und c) aus Sandhoff, 1977)

werden konnten (z.B. Huang, 1978). Ein weiterer wichtiger Hinweis sind die Befunde von Klenk und Yamakawa, daß jeder tierische Zelltyp ein eigenes Glykosphingolipid-Muster aufweist, das darüberhinaus auch spezies-spezifisch ist (Hakomori, 1965; Yamakawa, 1966). So gehören z.B. die Glykosphingolipide der Nervenzellen fast ausschließlich der Ganglio-Serie an, deren Grundkörper, das Gangliosid G_{M1} , in Abb. 1c dargestellt ist. (Als Ganglioside bezeichnet man speziell Glykosphingolipide, die N-Acyl-Neuraminsäure, auch als Sialsäure bezeichnet, enthalten.) Auch besitzen differenzierte Zellen ein komplexeres Muster als undifferenzierte oder Virustransformierte (Hakomori, 1975). Neuere Erkenntnisse sprechen sogar dafür, daß die Oligosialoganglioside in den synaptosomalen Plasmamembranen eine wichtige Rolle bei der Fusion von Membranen und damit bei der Transmitter-Ausschüttung spielen (Cumar et al., 1978).

Die Biosynthese der Glykosphingolipide erfolgt im Endoplasmatischen Reticulum und Golgi-Apparat und geht vom Ceramid aus, welches gebildet wird durch Übertragung eines Acyl-Restes von Acyl-Coenzym A auf die Aminogruppe des Sphingosins (das seinerseits aus Palmitoyl-Coenzym A und Glycin entsteht). Eine Reihe zellspezifischer Transferasen überträgt nun den Zucker aktivierter Zuckerderivate (UDP-Glukose, -Galaktose, -Fucose und -N-Acetyl-Galaktosamin, sowie CMP-Neuraminsäure) auf die terminale OH-Gruppe des Ceramids bzw. auf die wachsende Oligosaccharid-Kette. Der Sulfat-Rest in den Sulfatiden stammt aus 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) (vgl. Richardson et al., 1977; Landa et al., 1977).

Der biologische Abbau findet in den Lysosomen statt, wobei noch ungeklärt ist, wie die Glykolipide in das Lysosom gelangen. Er verläuft in umgekehrter Reihenfolge wie die Synthese: Verschiedene, jeweils für einzelne Zucker in bestimmter glykosidischer Bindung spezifische Exo-Glykosidasen hydrolysieren nacheinander den jeweils terminalen Zucker-Rest ab, z.B. wird im Gangliosid G_{M1} (Abb. 1c) die terminale Galaktose durch eine β -Galaktosidase abgespalten, anschließend wird der nunmehr endständige N-Acetyl-D-Galaktosamin-Rest von einer β -Hexosaminidase abgetrennt, usw.. Das letztlich übrigbleibende Ceramid wird von einer Ceramidase in freie Fettsäure und Sphingosin

gespalten (Gatt und Barenholz, 1973; Ledeen und Yu, 1973; Neufeld et al., 1975; Sandhoff, 1977).

Fehlt aufgrund eines biochemischen Defekts eine der am Abbau beteiligten Hydrolasen, so ist der Katabolismus an dieser Stelle unterbrochen, da die nachfolgenden Glykosidasen erst nach dem vom defekten Enzym katalysierten Schritt angreifen können, weil im Gegensatz zur Situation bei den Glykoproteinen für Glykolipide keine Endoglykosidasen existieren. Lipide können auch nicht wie wasserlösliche Metaboliten mit den Körperflüssigkeiten abtransportiert und ausgeschieden werden. Statt dessen werden sie im Organ ihrer Entstehung in sog. Speichergranula (pathologisch veränderten Lysosomen) abgelagert. Die Glykolipide sind in dieser Form zwar nicht eigentlich toxisch, überschreitet diese Speicherung jedoch ein gewisses Maß, so wird die Funktion des betroffenen Organs mehr und mehr beeinträchtigt und es kommt zum klinischen Bild einer Lipidspeicherkrankheit. Besonders tragische Folgen haben Störungen des Gangliosid-Abbaus, da diese Substanzklasse fast ausschließlich in Nervenzellen vorkommt und daher auch vorwiegend im Zentralnervensystem gespeichert wird, was neurologische Symptome wie Krämpfe, Lähmungen, Blindheit usw. zur Folge hat und innerhalb von einigen Jahren zum Tode des Patienten führt. Diese Enzymdefekte werden, soweit bisher untersucht, autosomal rezessiv vererbt (mit Ausnahme des x-chromosomal vererbten M. Fabry, eines α -Galaktosidase-Defekts) (vgl. z.B. Volk und Schneek, 1975).

Das Auftreten der Lipidosen hat frühzeitig das wissenschaftliche Interesse am Stoffwechsel der Glykosphingolipide begründet und dabei auftretenden biochemischen Störungen liefern wichtige Informationen über den normalen, ungestörten Metabolismus; so führte z.B. erst die Erforschung der Sphingolipidosen zur Entdeckung einer Reihe von Sphingolipiden wie der Ganglioside (E. Klenk, 1939, 1941 a und b, 1942 a und b; E. Klenk und H. Langerbeins, 1941; E. Klenk und F. Rennkamp, 1942) und des Glucocerebroside (Aghion, 1934).

Eine der am längsten bekannten und am besten untersuchten derartigen Sphingolipidosen ist die G_{M2} -Gangliosidose. Von dieser Krankheit, die ihren Namen von der hauptsächlich

in den Neuronen der Patienten gefundenen Speichersubstanz, dem Gangliosid G_{M2} , erhielt, sind bislang 3 biochemische Varianten gefunden worden (Sandhoff et al., 1971), die sich in der Natur des zugrundeliegenden Enzymdefekts unterscheiden, jedoch nur wenig im klinischen Verlauf:

Bei der "klassischen" Variante B (Tay-Sachs'sche Krankheit) fehlen das Enzym Hexosaminidase A (Sandhoff, 1969; Okada und O'Brien, 1969) und das Spurenenzym Hexosaminidase S, es kommt zur Speicherung des Gangliosids G_{M2} (Klenk et al., 1963; Svennerholm, 1963) und - in geringerer Menge - seines Asialoderivats G_{A2} .

Die Variante O ist gekennzeichnet durch das Fehlen der beiden Isoenzyme Hexosaminidase A und B (Sandhoff et al., 1968; Sandhoff und Harzer, 1973) und durch eine wesentlich stärkere Speicherung auch des Glykosphingolipids G_{A2} . Zusätzlich findet man in den visceralen Organen dieser Patienten noch eine Vermehrung des sog. Nierenglobosids.

Völlig unverständlich ist diesem Zusammenhang das Auftreten der Variante AB, bei der alle Hexosaminidase-Isoenzyme in normaler oder erhöhter Menge vorhanden sind (Sandhoff, 1969; Sandhoff et al., 1971; Brett et al., 1973; de Baeque et al., 1975) und sich weder biochemisch noch immunologisch von Enzymen normaler Gewebe unterscheiden (Conzelmann, 1976; Conzelmann et al., 1978). Trotzdem kommt es auch hier zu einer massiven Speicherung von Gangliosid G_{M2} und Glykosphingolipid G_{A2} .

Obwohl bereits eine ganze Reihe von Erkenntnissen sowohl über die Natur der beteiligten Enzyme und ihrer möglichen Defekte als auch über die gespeicherten Substrate vorliegen, ist man von einem Verständnis der Zusammenhänge noch ein gutes Stück entfernt. Noch sind einige grundlegende Frage offen:

Zwar wurden die Enzyme schon gereinigt und ihre Eigenschaften untersucht (Robinson und Stirling, 1968; Sandhoff, 1968; Srivastava et al., 1974; Geiger und Arnon, 1976), die für die Isoenzyme gefundenen Spezifitäten gegenüber den Lipidsubstraten (Sandhoff, 1970; Li et al., 1973; Sandhoff et al., 1977) sind jedoch nicht geeignet, die Speichermuster bei den verschiedenen Varianten auch quantitativ als Folge der jeweiligen Enzymdefekte zu erklären.

Bei der Untersuchung dieser Substrat-Spezifitäten begegnete man indessen einem prinzipiellen Problem der Lipid-Enzymatik: Die gereinigten Enzyme sind in vitro zunächst überhaupt nicht in der Lage, die gespeicherten Substanzen zu spalten. Erst die Gegenwart geeigneter Detergentien ermöglicht meßbare Umsätze (z.B. Frohwein und Gatt, 1967; Sandhoff und Wässle, 1971; Tallman und Brady, 1972; O'Brien et al., 1977). Es erhebt sich damit die Frage, ob und inwieweit die so gefundenen Spezifitäten für die Verhältnisse in vivo relevant sind. Welchen Einfluß haben diese Detergentien und wie aktivieren sie die enzymatische Reaktion ?

In vivo, d.h., im Lysosom der lebenden Zelle, sind derartige Detergentien nicht vorhanden. Wie geht dort der Abbau der Sphingolipide vor sich ? Gibt es andere Mechanismus oder Faktoren, die die Detergentien in vivo substituieren ? Wie können überhaupt wasserlösliche Enzyme ihre membranständigen Lipid-Substrate erreichen ?

Diese Frage ist möglicherweise auch ein zentraler Punkt für die Aufklärung der Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose. Die bisherigen Untersuchungen machen eine Enzym-Mutation als Ursache dieser Krankheit unwahrscheinlich. Statt dessen läßt sich neben einer Reihe anderer Möglichkeiten, wie z.B. einer Überproduktion der Glykolipide infolge einer Regulationsstörung bei der Biosynthese oder einer Lokalisationsstörung, auch an eine Störung der Enzym-Lipid-Wechselwirkung, etwa das Fehlen eines weiteren beteiligten Faktors, denken.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, durch die Beantwortung dieser Fragen einerseits die noch fehlenden, zum Verständnis aber notwendigen Schlüsselsteine in das Mosaikbild der G_{M2} -Gangliosidosen einzufügen, andererseits allgemein einen Beitrag zu einem wichtigen Teilaspekt der Lipidbiochemie, der Wechselwirkung löslicher Enzyme mit ihren membranständigen Lipid-Substraten, zu leisten.

Unverläßliche Voraussetzungen für die dazu durchgeführten experimentellen Arbeiten waren neben einer sehr empfindlichen Methode zur Messung des Gangliosid-Abbaus die Verwendung zur Homogenität gereinigter Enzympräparationen und sauberer Lipid-Substrate. Daher wurde als Vorarbeit ein Verfahren entwickelt um die Hexosaminidasen A und B in wenigen Schritten mit hoher

Ausbeute sehr rein zu isolieren (Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977).

Bei der Isolierung und radioaktiven Markierung der verwendeten Lipide konnte auf bereits beschriebene Verfahren zurückgegriffen werden. (s. Materialien und Methoden)

2. Die Detergensabhängigkeit des in-vitro-Abbaus der Glykosphingolipide G_{M2} und G_{A2} durch Hexosaminidasen

2.1. Einführende Bemerkungen

Die N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase (β -2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosid-acetamido-desoxy-glucosylhydrolase, EC 3.2.1.30) katalysiert spezifisch die Hydrolyse β -glykosidischer Bindungen zwischen N-Acetyl-D-glucosamin sowie N-Acetyl-D-galaktosamin und einer Reihe von Aglykonen. Beim Menschen findet man hauptsächlich 2 Isoenzyme, die Hexosaminidasen A und B, die beide als lysosomale Hydrolasen bei saurem pH-Wert optimale Aktivität entfalten. Zu ihren physiologischen Substraten zählen neben Oligosacchariden und Glykoproteinen auch einige Glykolipide, darunter vor allem das Gangliosid G_{M2} , sein Asialoderivat G_{A2} und das Nierenglobosid. Die Messung der Aktivität und Spezifität dieser Enzyme gegenüber ihren Glykolipid-Substraten stößt jedoch auf ein prinzipielles Problem der Lipid-Biochemie: Lipide können in vitro von gereinigten wasserlöslichen Enzymen nur sehr schlecht angegriffen werden. Erst der Einsatz geeigneter Detergentien ermöglicht gut meßbare Umsatzraten. Als Beispiel mögen die in Tabelle 1 angeführten, bereits publizierten Daten dienen. (Sandhoff et al., 1977)

Tabelle 1 : Abbau von Glykosphingolipiden durch Hexosaminidase A in Gegenwart und Abwesenheit von Taurodesoxycholat:

	Substrat	
	Gangliosid G_{M2}	Glykolipid G_{A2}
ohne Detergens	0,04 $\frac{n \text{ Mol}}{h \times U}$	0,03 $\frac{n \text{ Mol}}{h \times U}$
mit 2 mM TDC	5 "	51 "

Die Produkt-Bildung wurde in 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,2 bei einer Substrat-Konzentration von 0,25 mM (G_{M2}) bzw. 0,125 mM (G_{A2}) gemessen. Enzym-Menge und Inkubationszeit wurden so gewählt, daß der Umsatz in einem gut quantifizierbaren Bereich lag (5 - 20 % des eingesetzten Substrats).

Einer der Hauptgründe für den extrem langsam Umsatz von Glykolipiden *in vitro* ist wahrscheinlich deren Eigenschaft, sich in wässriger Lösung zu größeren Aggregaten, sogenannten Mizellen, zusammenzulagern. Diese Mizellen sind kugelförmige bis ellipsoide Gebilde aus etwa 100 Monomeren, alle so angeordnet, daß die unpolaren Kohlenwasserstoff-Ketten nach innen, die hydrophilen "Köpfe" nach außen, zur Wasserphase gerichtet sind. (Abb. 2)

Sie dürften aufgrund ihrer dichten Packung als Substrat für wasserlösliche Enzyme ungeeignet sein. Die Konzentration der im Gleichgewicht zu den Mizellen vorhandenen Monomeren (Tanford, 1973) liegt für Glykolipide sehr niedrig. (wahrscheinlich $<10^{-8}$ M, vgl. Ghidoni et al., 1978; Formisano et al., 1979) und spielt daher für die Umsatzrate praktisch keine Rolle.

Die zur Aktivierung des Lipid-Abbaus verwendeten Detergentien unterliegen im Prinzip den gleichen physikochemischen Gesetzen. Auch sie aggregieren in wässriger Lösung oberhalb einer bestimmten Konzentration (der kritischen Mizell-Konzentration, engl. critical micelle concentration = CMC) zu - allerdings kleineren - Mizellen.

Bislang ungeklärt ist, auf welche Weise diese Detergentien den Umsatz der Lipid-Substrate stimulieren. Es wäre z.B. denkbar, daß der Angriffspunkt am Enzymprotein liegt, daß dieses beispielweise unter dem Einfluß des Detergens seine Konformation ändert und so in eine Form übergeht, in der es auch Lipid-Mizellen angreifen kann. Alternativ ist auch vorstellbar, daß nicht das Enzym, sondern das Substrat aktiviert wird, etwa durch Bildung von kleinen Mischmizellen, in denen die Glykolipide für das Enzym besser zugänglich sind.

Im folgenden soll dieser Frage am Beispiel der durch Hexosaminidase A katalysierten Spaltung des Gangliosids G_{M2} und deren Aktivierung durch Gallensalze nachgegangen werden.

2.2. Der Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die Hexosaminidase A in Gegenwart von Detergentien

Der Einfluß von Detergentien auf den Abbau von Glykolipiden durch Hexosaminidasen läßt sich besonders gut am System Hexosaminidase A/Gangliosid G_{M2} untersuchen, da dafür ein sehr einfacher und hochempfindlicher Test zur Verfügung steht.

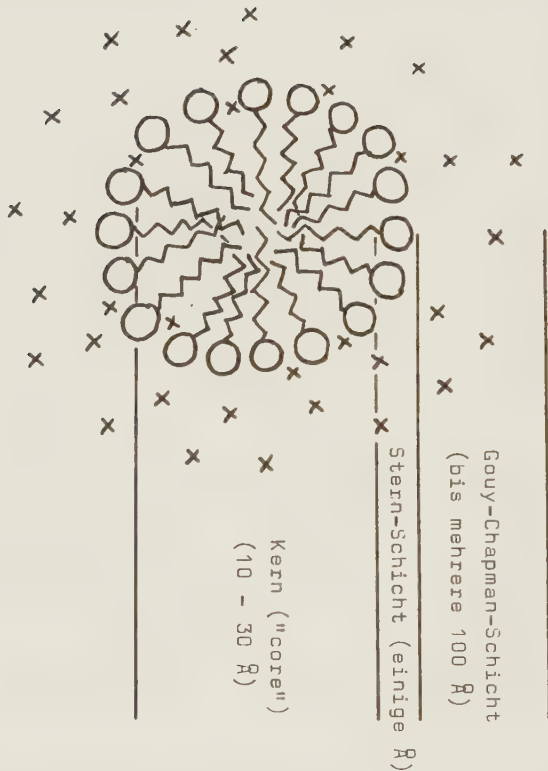


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch eine Mizelle
(nach Fendler und Fendler, 1970)

- hydrophile "Köpfe" der Lipide oder Detergentien
- ~~~~~ unpolare (hydrophobe) Kohlenwasserstoff-Ketten
- x Gegenionen (Bei geladenen Amphiphilen)

Die Ansatz-Bedingungen konnten dabei aus früheren Arbeiten übernommen werden (Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977):

Als lysosomale Enzyme besitzen die Hexosaminidasen saure pH-Optima, diese liegen für den Abbau von Glykolipiden in Gegenwart von Detergentien bei pH 4,2 (Sandhoff und Wässle, 1971). Der für diesen Bereich gewöhnlich verwendete Acetat-Puffer ist für Hexosaminidasen ungeeignet, da Acetat diese Enzyme kompetitiv hemmt. Statt dessen wurde Citrat-Puffer benutzt. Dieser wurde in einer Konzentration von 0,1 M eingesetzt, die bei pH 4,2 etwa der physiologischen Ionenstärke von 0,15 M entspricht. (Näheres in Material und Methoden)

2.2.1. Vergleich verschiedener Detergentien

Zur Stimulierung des von Hexosaminidasen katalysierten Glykolipid-Abbaus wurden in der Literatur bisher fast ausschließlich Gallensalze, vor allem Taurocholat-Präparationen verschiedener Reinheit, sowie Taurodesoxycholat angegeben. Daher wurde zunächst untersucht, welches dieser Detergentien sich am besten für das System Hexosaminidase A/Gangliosid G_{M2} eignet. Zum Vergleich wurde auch eine Reihe gebräuchlicher neutraler Detergentien mitgemessen. Abb. 3 zeigt den Einfluß einiger Gallensalze, sowie eines der neutralen Detergentien auf den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A. Die - anionischen - Cholate vermochten diesen Abbau mit unterschiedlichen optimalen Konzentrationen sehr stark zu steigern, während die nicht ionischen Detergentien sich alle als wirkungslos erwiesen.

Bemerkungswert ist der Zusammenhang zwischen den kritischen Mizellkonzentrationen und den optimal aktivierenden Konzentrationen der Gallensalze (Tabelle 2).

Die Tatsache, daß die maximale Aktivierung durch diese Gallensalze jeweils bei Konzentrationen erreicht wurde, bei denen bereits eine größere Menge an Mizellen vorliegt, weist stark daraufhin, daß diese Mizellen und nicht die Monomeren für die Aktivierung verantwortlich sind.

Das niedrigste Konzentrationsoptimum (2 mM) besaßen Taurodesoxycholat und Taurochenodesoxycholat. Ähnliche Detergensabhängigkeiten sind für den Abbau des Asialo-substrats G_{A2} seit längerem bekannt (Markianos und Sandhoff, unveröffentlichte Ergebnisse), deshalb wurden bislang die

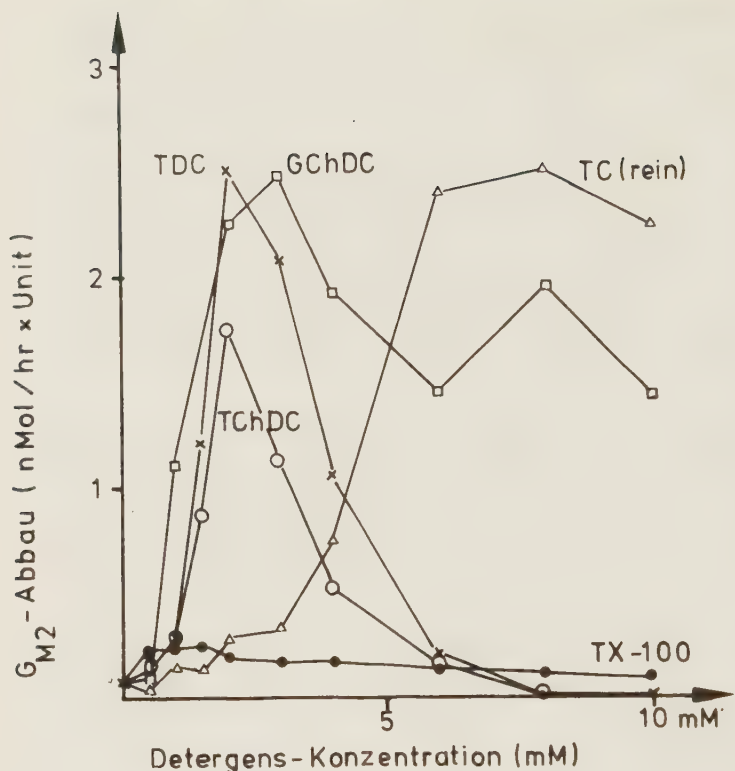


Abbildung 3: Einfluß verschiedener Detergentien auf den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A

Im Galaktosamin-Anteil tritiummarkiertes Gangliosid G_{M2} (10 nMol) wurde mit 0,1 U Hexosaminidase A sowie den angegebenen Detergentskonzentrationen in 40 μ l 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,2 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte N-Acetyl-D-Galaktosamin wurde dann wie unter Material und Methoden angegeben von nicht umgesetztem Substrat abgetrennt und quantifiziert.

Die Abkürzungen bedeuten:

TDC: Taurodesoxycholat

TChDC: Taurochenodesoxycholat

GChDC: Glykochenodesoxycholat

TC: Taurocholat

TX-100: Triton X-100

Tabelle 2 : Vergleich der optimal aktivierenden Konzentrationen mit den CMC einiger Gallensalze

Substanz	CMC ^{a)}	optimale Konzentration
Taurocholat (roh)	1,35 mM	5 mM
Taurocholat (rein)	3,2 mM	8 mM
Taurodesoxycholat	0,8 mM	2 mM
Taurochenodesoxycholat	0,9 mM	2 mM
Glykodesoxycholat	0,9 mM	3 mM

- a) Die CMC wurden nach dem Verfahren von Becher (1962) mit Rhodamin 6G im Inkubationspuffer bestimmt.
(Einzelheiten unter Material und Methoden)

meisten Messungen zum Abbau von Glykolipiden durch Hexosaminidasen, insbesondere zur Untersuchung pathobiochemischer Fragen, mit Taurodesoxycholat durchgeführt.

Auch im folgenden soll der Mechanismus der Aktivierung des Lipidabbaus durch Detergentien am Beispiel dieses Gallensalzes untersucht werden.

2.2.2. Einfluß des Detergens auf den Abbau wasserlöslicher Substrate

Wasserlösliche Substrate wie z.B. p-Nitrophenyl- oder 4-Methylumbelliferylglykoside werden von den Hexosaminidasen auch in Abwesenheit von Detergentien hydrolysiert. Wenn die Funktion des Detergens beim Lipid-Abbau darin besteht, das Enzym zu aktivieren, so ist zu erwarten, daß auch der Umsatz dieser wasserlöslichen Substrate durch Detergenszusatz beschleunigt wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Vielmehr wird der Abbau dieser Substrate, wie Abb. 4 am Beispiel des 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminids zeigt, durch Taurodesoxycholat sehr stark gehemmt.

Damit kann zwar ein möglicher Mechanismus - eine allgemeine Aktivierung des Enzyms - ausgeschlossen werden, es bleiben jedoch noch eine Reihe von Möglichkeiten für die Aktivierung des Lipidabbaus durch Detergentien: Einerseits könnte das Lipid durch das Detergens in eine geeignete Substratform überführt werden, andererseits ist es nach wie vor denkbar, daß der Angriffspunkt doch am Enzym liegt, etwa in der Art einer

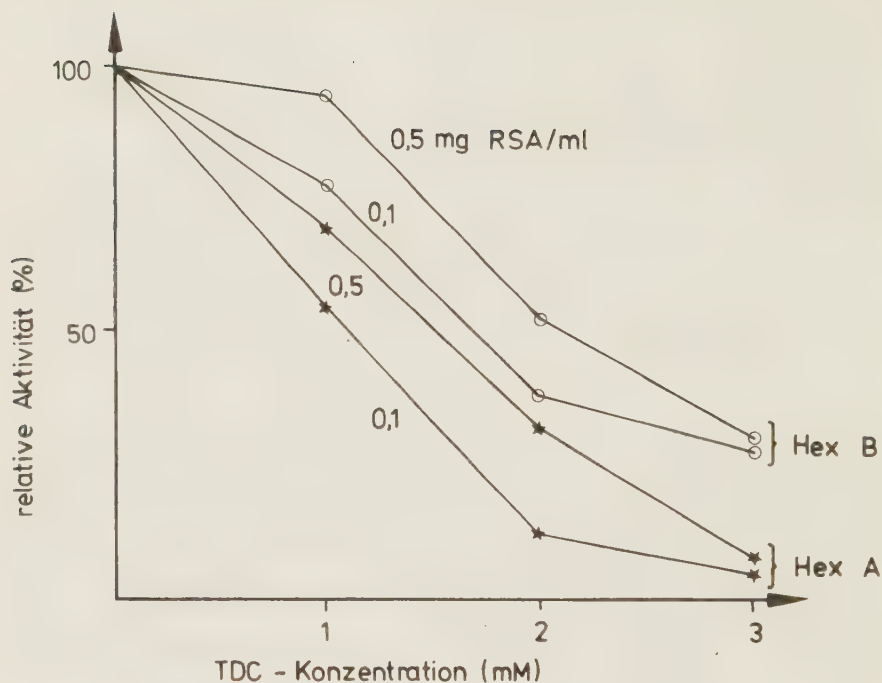


Abbildung 4: Einfluß von Taurodesoxycholat auf den Abbau eines wasserlöslichen Substrats durch die Hexosaminidasen A und B

Etwa 0,2 U Hexosaminidase A oder B wurden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von Taurodesoxycholat (TDC) und Rinderserumalbumin (RSA) mit 1 mM 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid als Substrat in 0,2 ml 50 mM Citrat-Puffer, pH 4,4, 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die fluorimetrische Messung des freigesetzten 4-Methylumbelliferons erfolgte wie unter Material und Methoden angegeben.

Hex A: Hexosaminidase A

Hex B: Hexosaminidase B

" Umschaltung " von einer Form, die wasserlösliche Substrate abbaut in eine andere Konformation, die Lipide bevorzugt.

Einen wesentlichen Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen lieferte die Messung der Zeitabhängigkeit der Enzymreaktionen in Gegenwart von Detergentien.

2.2.3. Zeitabhängigkeit der enzymatischen Reaktion unter dem Einfluß von Detergentien

Der Abbau des Gangliosids G_{M2} steigt in Gegenwart von TDC nicht linear mit der Zeit an, sondern die Abbaurrate fällt mit fortschreitender Zeit auf sehr niedrige Werte ab (Abb. 5). Ein ähnliches Bild ergibt sich auch mit dem wasserlöslichen Substrat: Während die Reaktion ohne Detergens linear verläuft, erreicht der Abbau in Gegenwart von TDC sehr bald ein Plateau. Dies läßt sich nicht mit einer Produkt-Hemmung erklären, da die Reaktionsprodukte in beiden Fällen entweder gar nicht inhibieren (4-Methylumbelliferon, G_{M3}) oder wie N-Acetyl-D-galaktosamin Hemmkonstanten besitzen, die weit über den hier erreichten Konzentrationen liegen (vgl. Sandhoff und Wässle, 1971). Auch tritt in Abwesenheit von Detergentien mit synthetischen Substraten keine Hemmung auf.

Die gemessenen Werte lassen sich jedoch gut mit der Annahme erklären, daß das Enzym durch das Detergens zeitabhängig inaktiviert wird und zwar um so schneller, je höher die Detergenskonzentration ist.

Nimmt man dabei an, daß die Inaktivierung des Enzyms in 1. Näherung einer Kinetik 1. Ordnung folgt und setzt man die resultierende Zerfallsgleichung in die Michaelis-Menten-Gleichung ein, so erhält man den komplexen Ausdruck

$$[S_0] - [S_1] + K_M \ln \frac{[S_0]}{[S_1]} = \frac{V_{\max}}{k} \cdot (1 - e^{-kt_1})$$

($[S_0]$ = anfängliche Substratkonzentration, $[S_1]$ = Substratkonzentration zur Zeit t_1 , $V_{\max}$ = Maximalgeschwindigkeit bei der anfänglichen Enzym-Konzentration, K_M = Michaelis-Konstante, k = Zeitkonstante der Enzyminaktivierung $[= \ln 2 / \text{Halbwertszeit}]$), der sich bei relativ geringen Abbauraten (wenige %), also $[S] \approx \text{const.}$, zu

$$[P] = \frac{V_{\max}}{k} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \cdot (1 - e^{-kt_1})$$

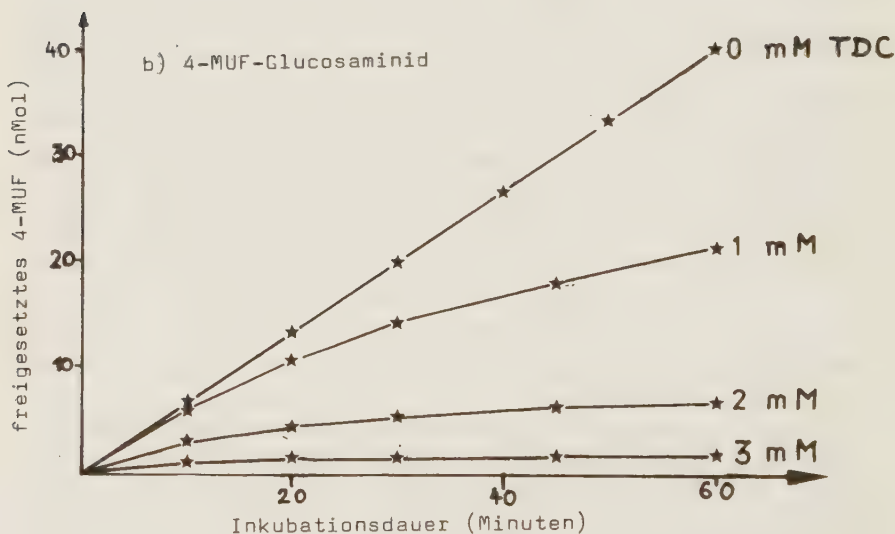
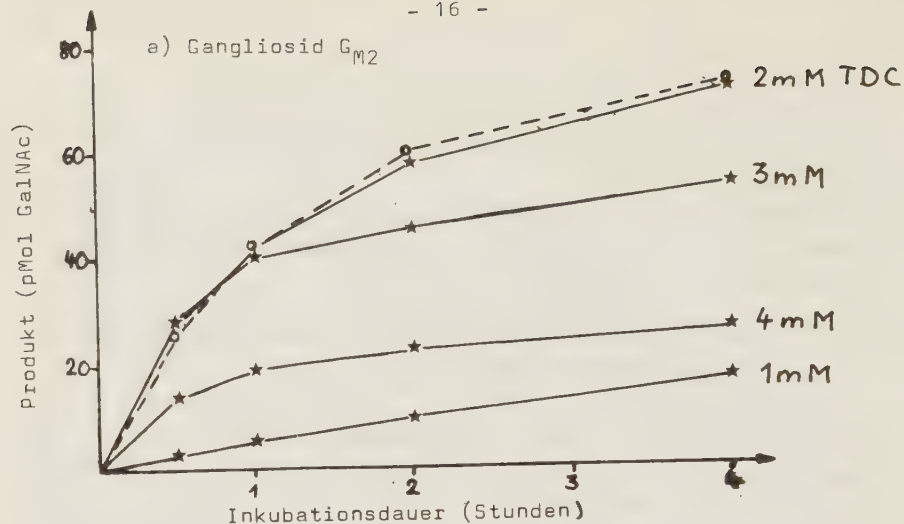


Abbildung 5: Zeitabhängigkeit des Abbaus von Gangliosid G_{M2} und von 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid bei verschiedenen Detergensenkonzentrationen

a) Im Galaktosamin-Anteil tritiummarkiertes Gangliosid G_{M2} (10 nMol) wurde mit 0,1 U Hexosaminidase A für die angegebenen Zeiten in 40 μ l 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Taurodesoxycholat bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte N-Acetyl-D-galaktosamin wurde wie unter Material und Methoden angegeben von nicht umgesetztem Substrat abgetrennt und quantifiziert.

—○— theoretisch berechnete Kurve (s. Text)

b) Hexosaminidase A (0,2 mU) wurde in 0,2 ml 50 mM Citrat-Puffer, pH 4,4, mit 1 mM 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid als Substrat sowie 0,5 mg Rinderserumalbumin/ml und verschiedenen Konzentrationen an Taurodesoxycholat für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der Stopplösung wurde das freigesetzte 4-Methylumbelliferon fluorimetrisch bestimmt.

vereinfacht. ($[P] = [S_0] - [S_1] =$ Konzentration des Produkts zur Zeit t_1)

Eine nach dieser Formel berechnete Kurve ist in Abb. 5a gestrichelt eingezeichnet. (Dabei wurden eine Anfangsgeschwindigkeit $\left[V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \right]$ von $3,1 \text{ n Mol/h} \times U$ und eine Halbwertszeit von 49 min. zugrunde gelegt.) Innerhalb der Meßgenauigkeit stimmen die berechneten Werte sehr gut mit den gemessenen überein.

Die Enzym-Inaktivierung durch Detergentien läßt sich auch direkt messen (Abb. 6) : Dazu wurde Hexosaminidase A zunächst in höherer Konzentration in Gegenwart von Rinder-serumalbumin und verschiedenen Mengen an TDC bei 37° C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen und in einen Inkubationsansatz zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit synthetischen Substrat (4 MUF-GlcNAc) überführt. Dadurch wurde gleichzeitig das Detergens auf eine sehr geringe Konzentration ($\leq 0,15 \text{ mM}$) verdünnt. Die halblogarithmische Darstellung der verbleibenden Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit der Inaktivierung ergibt annähernd Geraden, aus denen sich die Halbwertszeiten entnehmen lassen. (Bei genauer Auswertung beobachtet man allerdings eine Abweichung dergestalt, daß die Halbwertszeit langsam zunimmt, wahrscheinlich, weil die Denaturierung mit einer Bindung des TDC an Protein verbunden ist, wodurch die Konzentration an freiem Detergens abnimmt.)

Eine interessante Konsequenz dieser langsamen Inaktivierung des Enzyms durch das Detergens ist in Abb. 7a veranschaulicht: Trägt man die in Abb. 5a enthaltenen Meßergebnisse in anderer Form auf (Abbau pro Stunde und pro Enzym-Einheit gegen die Inkubationszeit für verschiedene Detergenskonzentrationen), so erkennt man, daß die berechnete Abbaurrate pro Zeit und Enzym-einheit nicht nur von der Detergenskonzentration, sondern auch sehr stark von der Inkubationsdauer abhängt. Diese Abbauraten werden aber in der klinischen Diagnostik von Enzymdefekten, insbesondere bei fraglichen Fällen - etwa nur partiellen Enzymausfällen -, häufig zu Rate gezogen.

Auch das Optimum der Detergenskonzentration ändert sich geringfügig mit der Inkubationsdauer: Bei kürzerer Inkubationszeit liegt das Optimum bei höherer Detergenskonzentration (Abb. 7b).

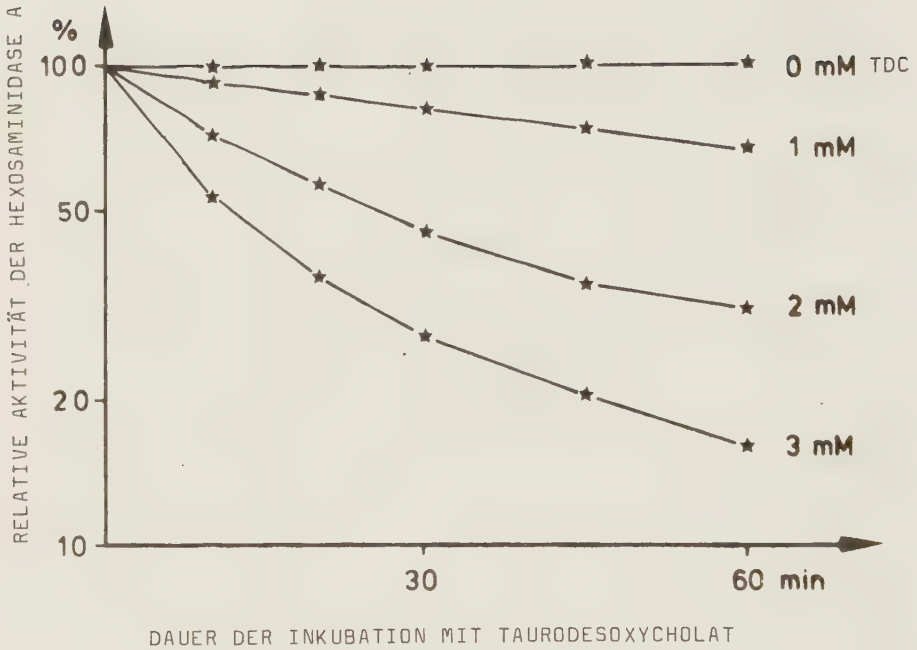


Abbildung 6: Zeitabhängigkeit der Enzym-Inaktivierung durch Taurodesoxycholat

Hexosaminidase A wurde zunächst in einer Konzentration von 0,3 U/ml mit 0,5 mg Rinderserumalbumin/ml und den angegebenen Konzentrationen an Taurodesoxycholat in dest. Wasser bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot von 10 µl entnommen, in einen eisgekühlten Inkubationsansatz von 0,2 ml (50 mM Citrat, pH 4,4, 1 mM 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid als Substrat) überführt und dieser weitere 5 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung beendet und das freigesetzte 4-Methylumbelliferon fluorimetrisch bestimmt.

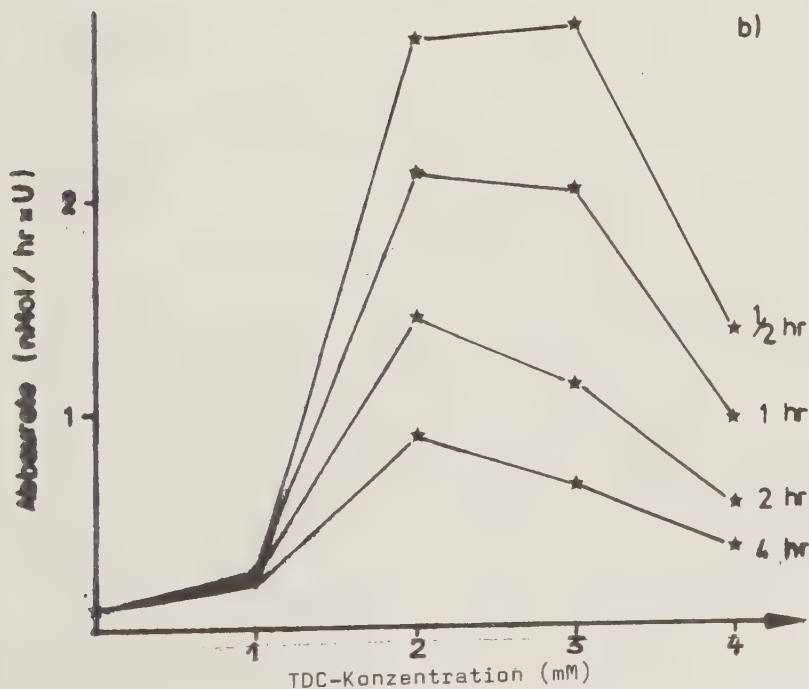
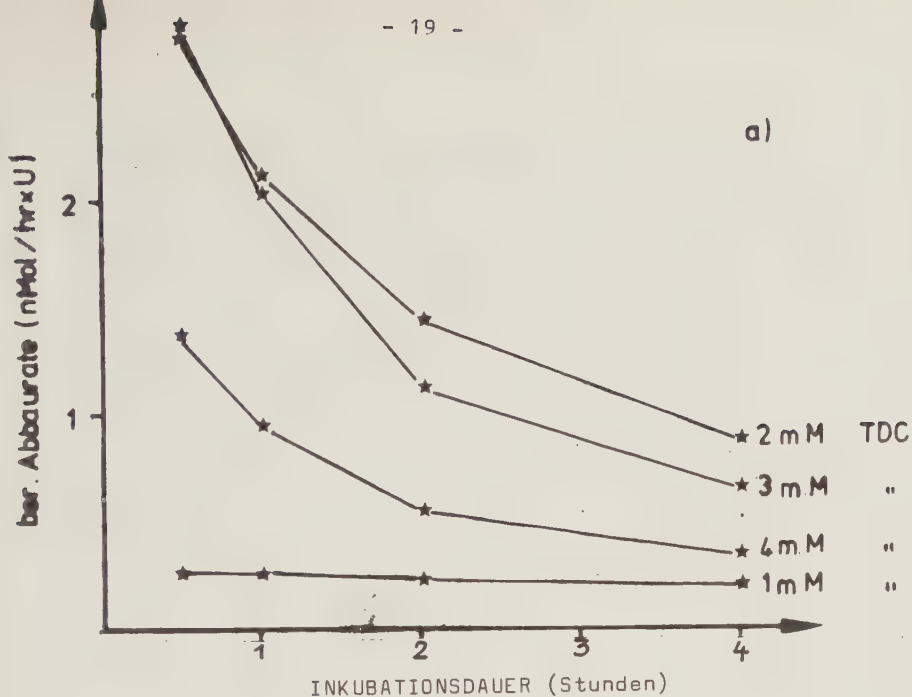


Abbildung 7: Einfluß der Inkubationsdauer auf die gemessene Abbaurrate des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A bei verschiedenen Detergentskonzentrationen

Die Daten sind dieselben wie in Abb. 5a.

2.2.4. Einfluß der Ionenstärke

Die thermodynamischen und kinetischen Parameter von Lipiden und Detergentien in wässriger Lösung werden nicht zuletzt durch die Ionenstärke der Lösung beeinflusst. Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit des enzymatischen Abbaus a) von Gangliosid G_{M2} in Gegenwart verschiedener Detergens-Konzentrationen und b) von 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-glucosaminid durch höhere Salz-Konzentrationen verlangsamt. Dies spricht eher für eine Behinderung des Enzyms als für einen Einfluß auf die Lipid/Detergenswechselwirkung, zumal sich die CMC von TDC mit steigender Ionenstärke nur unwesentlich verringert (Abb.9).

Es sei noch darauf hingewiesen, daß der G_{M2} -Abbau unter den hier gewählten Inkubationsbedingungen im Gegensatz zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen Messung bei höheren Detergensenkonzentrationen nicht zurückgeht, sondern auf einem Plateau bleibt. Dies liegt an der relativ kurzen Inkubationsdauer (30 Min.) und stützt weiter die Vorstellung einer langsamen Inaktivierung des Enzyms durch Taurodesoxycholat.

2.2.5. Protein-Abhängigkeit

Der Abbau von Gangliosid G_{M2} nimmt in Gegenwart von 2 mM TDC mit steigender Enzym-Menge bis etwa 0,4 Hexosaminidase A/Ansatz fast linear zu. Abb. 10 zeigt diese Abhängigkeit für 2 verschiedene Inkubationszeiten.

2.2.6. Einfluß der Substrat-Konzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)

Die Abhängigkeit des Gangliosid-Umsatzes von der Substratkonzentration in Gegenwart von 2 mM TDC entspricht zwar der nach der klassischen Theorie der Enzymkinetik (Michaelis und Menten, 1913) zu erwartenden Sättigungskurve (Abb. 11a), die Darstellung im doppelt reziproken Diagramm (Lineweaver und Burk, 1934), die im klassischen Fall eine Gerade ergibt, enthüllt jedoch eine deutliche Abweichung (Abb. 11b). Daher sind eine eindeutige Michaelis-Konstante oder Maximalgeschwindigkeit nicht zu festzulegen.

Näherungsweise liegen diese Konstanten bei 30 - 40 mM für K_M und 5 - 10 nMol/h x U (0,5 - 1 μ Mol/h x mg) für V_{max} .

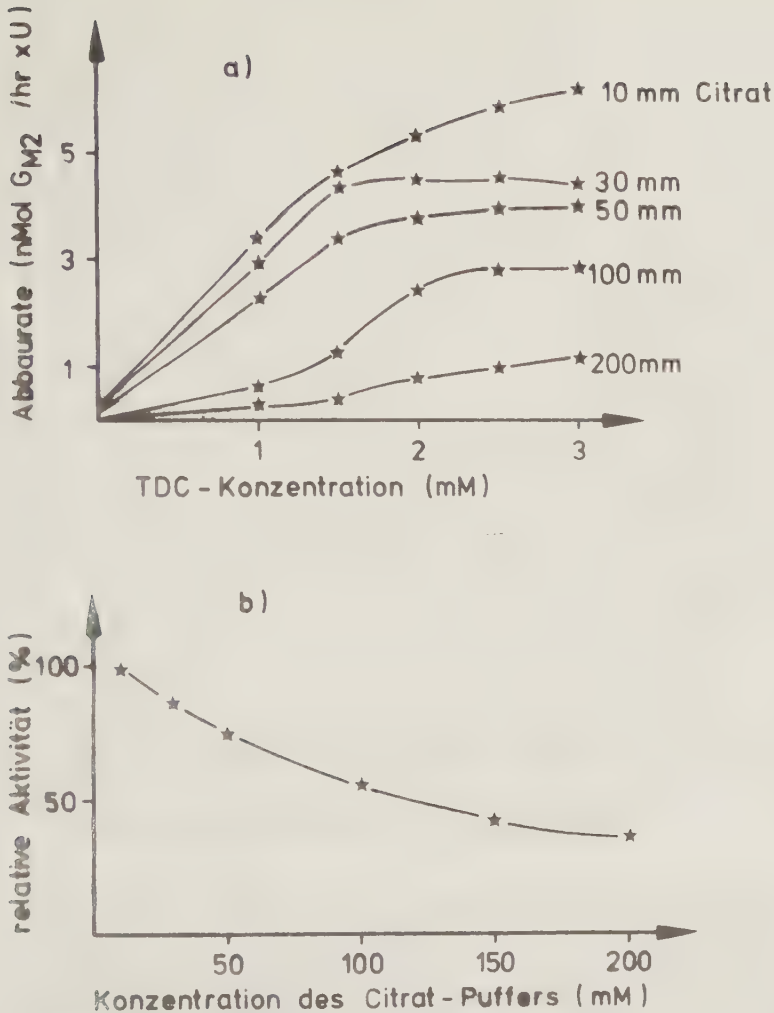


Abbildung 8: Abhängigkeit der Enzym-Reaktion von der Ionenstärke

a) Jeweils 10 nMol im Galaktosamin-Anteil tritiiertes Gangliosid G_{M2} wurden mit 0,1 U Hexosaminidase A und der angegebenen Menge an Taurodesoxycholat in einem Volumen von 40 μ l eines Citrat-Puffers, pH 4,2, der angegebenen Konzentration 30 Min. bei 37°C inkubiert. (Die Ionenstärke entspricht etwa der 1,5-fachen Pufferkonzentration). Das freigesetzte GaINAc wurde abgetrennt und quantifiziert (s. Mat. und Meth.).

b) Das wasserlösliche Substrat 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid wurde in einer Konzentration von 1 mM in 0,2 ml Citrat-Puffer, pH 4,4, der angegebenen Konzentration mit 0,2 mU Hexosaminidase A bei 37°C inkubiert. Nach 30 Min. wurde die Reaktion wie üblich durch Zugabe der Stopplösung (1 ml) beendet und das freigesetzte 4-Methylumbelliferon fluorimetrisch bestimmt.

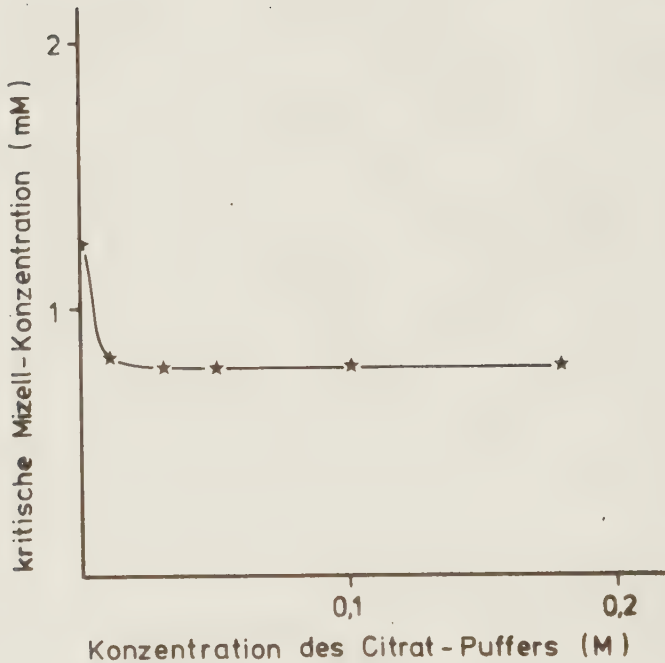


Abbildung 9: Abhängigkeit der kritischen Mizellkonzentration von Taurodesoxycholat von der Konzentration des Puffers

Taurodesoxycholat wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 10 mM) in Lösungen von 5 mg des Farbstoffs Rhodamin 6 G pro Liter in Citrat-Puffern, pH 4,2, unterschiedlicher Citrat-Konzentration gelöst. Die Extinktion dieser Lösungen bei 550 nm wurde gemessen und gegen den Logarithmus der Taurodesoxycholat-Konzentration aufgetragen. Ein scharfer Anstieg der Extinktion zeigt das Überschreiten der kritischen Mizellkonzentration an (Becher, 1962).

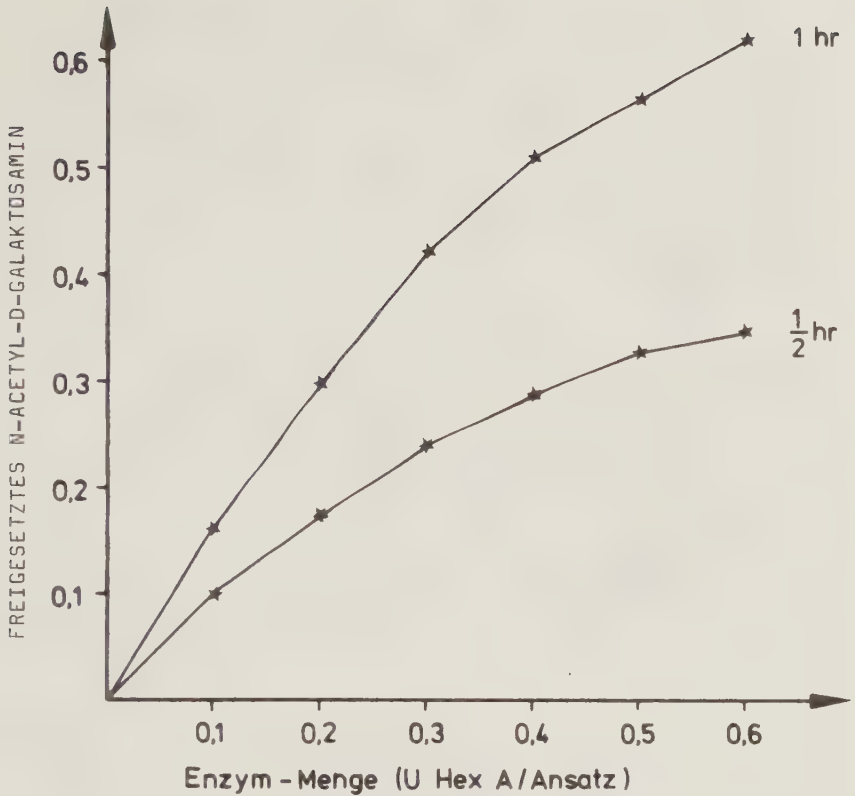


Abbildung 10: Protein-Abhängigkeit der Gangliosid-Spaltung

Je 10 nMol im Galaktosamin-Anteil tritiummarkiertes Gangliosid G_{M2} wurden für 1/2 bzw. 1 Stunde in Gegenwart von 2 mM Taurodesoxycholat in 40 μ l 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, mit den angegebenen Mengen an Hexosaminidase A bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte GalNAc wurde wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

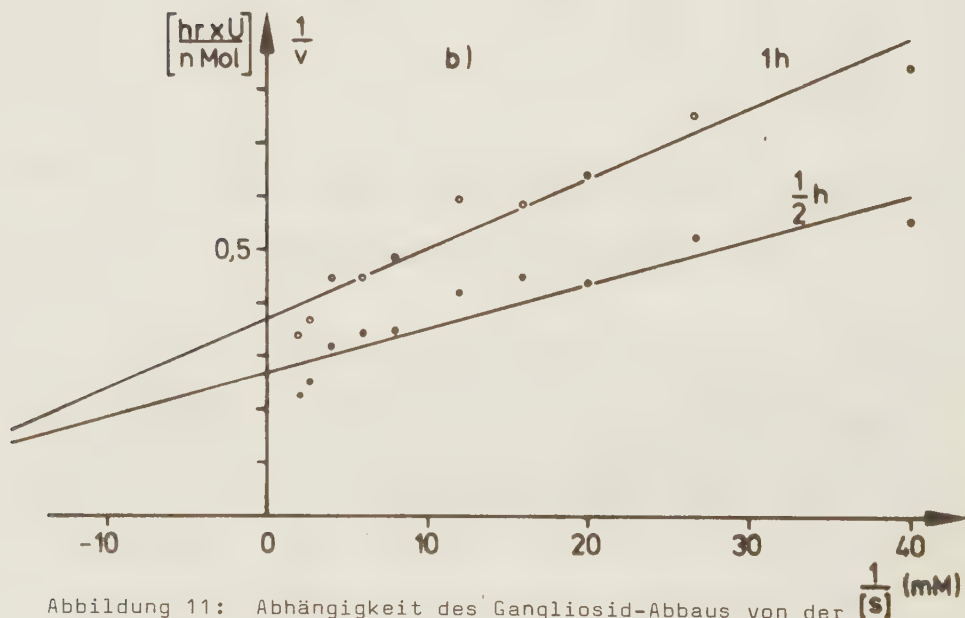
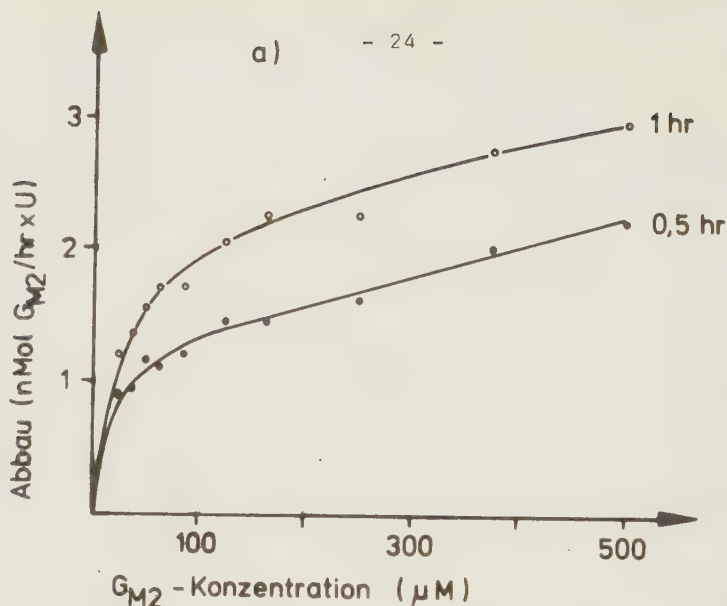


Abbildung 11: Abhängigkeit des Gangliosid-Abbaus von der Substratkonzentration

Jeweils 0,1 U Hexosaminidase A wurden in 40 μl Citrat-Puffer pH 4,2 mit 2 mM Taurodesoxycholat und der angegebenen Konzentration an im Galaktosamin-Anteil tritiiertem Gangliosid G_{M2} für 30 Min. bzw. 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte N-Acetyl-D-galaktosamin wurde wie unter Material und Methoden angegeben abgetrennt und anhand seiner Radioaktivität bestimmt.

a) Normale Darstellung

b) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver und Burk (1934)

Die Lineweaver-Burk-Diagramme für den Abbau der wasserlöslichen 4-Methylumbelliferyl-Substrate sind dagegen linear (Conzelmann, 1976), was dafür spricht, daß die Hexosaminidase A der klassischen Enzym-Kinetik gehorcht und die beobachteten Abweichungen wiederum auf Besonderheiten des Detergens-haltigen Systems beruhen. So wurde die TDC-Konzentration (2 mM) z.B. für eine bestimmte Substratkonzentration (0,25 mM) optimiert, d.h., bei anderen Substratkonzentrationen liegt ein anderes, möglicherweise weniger günstiges Lipid/Detergens-Verhältnis vor.

2.2.7. Zusammenfassung der Versuche zum Einfluß der Detergentien auf die enzymatische Gangliosid-Spaltung

Der Abbau des Gangliosids G_{M2} durch das wasserlösliche Enzym Hexosaminidase A wurde durch verschiedene Detergentien aus der Gruppe der Gallensalze um den Faktor 100 oder mehr stimuliert. Optimal waren dabei Detergenskonzentrationen im Bereich der 2-3 - fachen CMC. Eine Reihe nichtionischer Detergentien vom Polyätherphenol-Typ (Triton CF 54, X-100, X-114, N-101, sowie Tween 20) erwiesen sich dagegen als wirkungslos.

Mechanistisch beruht diese Aktivierung sehr wahrscheinlich auf der Bildung von Mischmizellen zwischen Lipid und Detergens: Die in Abwesenheit von Detergens vorliegenden Substrat-Mizellen können wegen ihrer Größe und ihrer dichten Packung von Enzym nicht angegriffen werden. Gallensalze bilden dagegen sehr kleine Mizellen (Helenius und Simons, 1975) und damit wohl auch entsprechend kleine Mischmizellen mit Gangliosiden. Sie erleichtern damit den Angriff der Hexosaminidase am Lipid-Substrat.

Für diesen Mechanismus spricht zum einen der Zusammenhang zwischen optimaler Konzentration des Gallensalzes und dessen kritischer Mizellkonzentration, zum anderen die Tatsache, daß der Abbau des wasserlöslichen Substrats 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-glucosaminid durch Detergens nicht aktiviert wird.

Auch ist für den Abbau anderer Lipidsubstrate der Hexosaminidasen, nämlich Glykosphingolipid G_{A2} und Nierenglobosid, ebenfalls eine Taurodesoxycholat-Konzentration von 2 mM optimal, unabhängig davon, welches Isoenzym,

Hexosaminidase A oder Hexosaminidase B, eingesetzt wird (Sandhoff und Wässle, 1971; Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977).

Das Enzymprotein selbst wird durch Gallensalze in der für die Aktivierung des Lipid-Umsatzes optimalen Konzentration bereits langsam denaturiert. Infolgedessen hängen der Abbau sowohl des wasserlöslichen als auch der Lipidsubstrate unter diesen Bedingungen nicht linear von der Inkubationsdauer ab, sondern erreichen schon nach kurzer Zeit ein Plateau.

Dies bedeutet jedoch auch, daß quantitative Werte für den Abbau von Sphingolipiden durch Hexosaminidasen, soweit sie mit Detergentien gemessen wurden, mit großer Vorsicht zu interpretieren sind.

Die Abhängigkeit der Abbauraten von der Substrat-Konzentration folgt ungefähr der normalen Sättigungskinetik nach Michaelis und Menten (1913). Ein doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver und Burk (1934) enthüllt jedoch eine gewisse Abweichung, die auf noch unbekannte Besonderheiten des detergenschaltigen Systems zurückzuführen ist.

Das physikochemische Verhalten der anderen Gallensalze, die den Gangliosid-Abbau durch Hexosaminidasen aktivieren, entspricht qualitativ dem des TDC (Helenius und Simons, 1975). Von einer Ausdehnung der Untersuchung auf diese Verbindungen sind daher keine prinzipiell neuen Erkenntnisse zu erwarten; deswegen wurde auf weitere Messungen verzichtet.

2.3. Substrat-Spezifität der Isoenzyme in Gegenwart von Taurodesoxycholat

Bei 3 verschiedenen biochemischen Varianten der G_{M2} -Gangliosidose, die mit unterschiedlichen Isoenzymdefekten einhergehen, findet man unterschiedliche Muster der Speicherung von Glykosphingolipiden in den Geweben der Patienten (Tabelle 3).

Wenn die gefundenen Isoenzym-Defekte wirklich ursächlich für die entsprechenden Krankheitsformen sind, so ist zu erwarten, daß die Substratspezifitäten der Isoenzyme gegenüber den Glykolipiden die bei ihrem Ausfall auftretenden Speichermuster erklären.

Tabelle 3 : Vermehrung der Sphingolipide bei 3 verschiedenen Formen der infantilen G_{M2} -Gangliosidose (Nach Sandhoff et al., 1971) (in % des Trockengewichts)

	Variante			Normale Kontrolle
	B	O	AB	
defektes Isoenzym	Hex. A	Hex. A u. B	keines	keines
Gangliosid G_{M2} (Hirn)	10,40	7,73	14,70	0,13
Glykolipid G_{A2} (")	0,79	3,37	2,80	0,03
Nierenglobosid (Niere)	0,2	1,2	0,1	0,1

Diese Spezifitäten der Hexosaminidasen A und B gegenüber den Sphingolipid-Substraten wurden bereits früher in vitro in Gegenwart von 2 mM TDC gemessen (Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977). Sie sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4 : Spaltung der bei Patienten der G_{M2} -Gangliosidose gefundenen Glykolipide durch die Hexosaminidasen A und B in Gegenwart von Taurodesoxycholat (2mM; alle Werte in nMol Lipid/hr x Enzym-Einheit).

Substrat	Enzym	
	Hexosaminidase A	Hexosaminidase B
Gangliosid G_{M2}	2,8 - 4 *	0,35
Glykolipid G_{A2}	51	170
Nierenglobosid	150	240

* vgl. Abschn. 2.2.

Diese Spezifitäten können die gefundenen Speicher-muster zwar qualitativ, nicht aber quantitativ erklären. So ist die Hexosaminidase B gegenüber der Haupt-Speicher-substanz Gangliosid G_{M2} zwar weit weniger aktiv als das A-Isoenzym, die gemessene Restaktivität müßte aber eigentlich ausreichen, die anfallenden Substratmengen zu verarbeiten. Auch ist nicht zu verstehen, warum es bei der Variante B überhaupt zu einer Anhäufung des Asialo-Derivats G_{A2} kommen kann. Die Variante AB endlich, bei der nach eingehenden Untersuchungen (Conzelmann et al., 1978) offenbar beide Isoenzyme intakt sind, bleibt in diesem Zusammenhang völlig unverständlich.

Es muß angenommen werden, daß die Spezifitäten der Enzyme in Gegenwart von Detergentien nicht die in-vitro-Spezifitäten repräsentieren. Damit rückt wieder die Frage in den Vordergrund, wie diese wasserlöslichen Enzyme in vivo Zugang zu ihren membranständigen Substraten erhalten, also welche Mechanismen oder Faktoren im Lysosom der Zelle die Aufgabe der Detergentien übernehmen.

3. Isolierung und Charakterisierung des Aktivatorproteins für den Abbau von Sphingolipiden durch Hexosaminidase A

3.1. Bereits bekannte Aktivatorproteine für andere am Glyko- lipidabbau beteiligte lysosomale Enzyme

Bei der Anreicherung der Arylsulfatase A fanden Jatzkewitz und Mehl, daß dieses Enzym nach einem bestimmten Reinigungsschritt die Fähigkeit verloren hatte, den Schwefelsäureester des Galaktocerebrosids ("Sulfatid") zu spalten, das wasserlösliche Substrat p-Nitrocatecholsulfat dagegen nach wie vor umsetzte. Erst der Zusatz einer anderen, enzymatisch inaktiven Fraktion gab der gereinigten Arylsulfatase die Spezifität einer Cerebrosidsulfat-Sulfatase zurück (Mehl und Jatzkewitz, 1964). Der dafür verantwortliche Faktor, von den Autoren als "Aktivator der Cerebrosid-Sulfatase" bezeichnet (Jatzkewitz und Stinshoff, 1973), konnte von Fischer isoliert und als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 21500 identifiziert werden (Fischer und Jatzkewitz, 1975). Als Resultat einer Reihe von Bindungs- und Abbau-Studien schlugen Jatzkewitz und Fischer schließlich ein Modell für den Mechanismus dieser Aktivierung vor: Danach bindet der Aktivator das Sulfatid im Verhältnis 1:1 und dieser Aktivator-Lipid-Komplex ist das eigentliche Substrat für die Sulfatase. Diese kann die von Sulfatiden in wässriger Lösung gebildeten Mizellen bei physiologischen Ionenstärken nicht angreifen (Fischer und Jatzkewitz, 1978).

Li und Mitarbeiter beschrieben ein ähnliches Aktivatorprotein mit etwa demselben Molekulargewicht, jedoch anderer Spezifität: Dieses Protein stimuliert vorwiegend den Abbau des Gangliosids G_{M1} durch eine β -Galaktosidase (Li und Li, 1976). Auch der Umsatz des Gangliosids G_{M2} wird durch dieses Präparat geringfügig aktiviert, dies scheint aber ein biologisch bedeutungsloser Nebeneffekt zu sein (Sandhoff et al., 1977).

Weitere Sphingolipide, für deren enzymatischen Abbau Aktivatorproteine nachgewiesen wurden, sind Glucocerebrosid (Ho und O'Brien, 1971) und Sphingomyelin (Baraton und Revol, 1977).

Nach subzellulärer Fraktionierung der Rattenleber konnte Mraz im Lysosol osmotisch geschockter sekundärer

Lysosomen in einer "hochmolekularen" Fraktion die Hydro-lasen und in der "niedermolekularen" Fraktion die Aktivatoren für den Abbau von Glucocerebrosid, Galaktocerebrosid, Cerebrosidsulfat (Sulfatid), Glykosphingolipid G_{A2} und Sphingomyelin nachweisen (Mraz et al., 1976).

Im folgenden sollen Nachweis, Reinigung und Eigenschaften des Aktivatorproteins für den Abbau von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} durch Hexosaminidasen beschrieben werden.

3.2. Nachweis und Reinigung des Aktivators für die enzymatische Spaltung der Glykolipide G_{M2} und G_{A2}

3.2.1. Nachweis in Extrakten verschiedener Gewebe

Zunächst wurde geprüft, welche Gewebsextrakte die enzymatische Glykolipidspaltung stimulieren. Dazu wurden die Gewebe in der 10-fachen Menge destillierten Wassers homogenisiert, die Homogenate zentrifugiert, die Überstände zur Inaktivierung der in den Geweben enthaltenen Hexosaminidasen für 1 Stunde auf 60°C erhitzt (vgl. dazu Abschn. 3.2.2.) und ausgefallenes Protein abzentrifugiert. Aliquote der klaren Überstände, in denen keine Hexosaminidase mehr nachweisbar war, wurden im enzymatischen Test auf ihre Fähigkeit untersucht, den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A zu stimulieren. Abb. 12 zeigt den erzielten Abbau in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Extrakt-Protein. Während der Leberextrakt nur eine geringfügige Aktivierung zeigte, die durch größere Proteinmengen wieder aufgehoben wurde, stimulierte der Nierenextrakt den Gangliosidabbau bis zum 18-fachen. Der Hirnextrakt enthielt relativ wenig Protein und verhielt sich ähnlich wie der Leberextrakt. Die weiteren Experimente wurden daher mit Nierenextrakten durchgeführt.

3.2.2. Hitzebehandlung der Extrakte

Aliquote eines 10 %igen wässrigen Nierenextraktes wurden 1 Stunde auf Temperaturen zwischen 40°C und 90°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert. In den Überständen wurde die Hexosaminidase-Aktivität gegenüber dem wasserlöslichen Substrat sowie ihre Fähigkeit, den Gangliosidabbau zu aktivieren, gemessen und mit den entsprechenden Werten

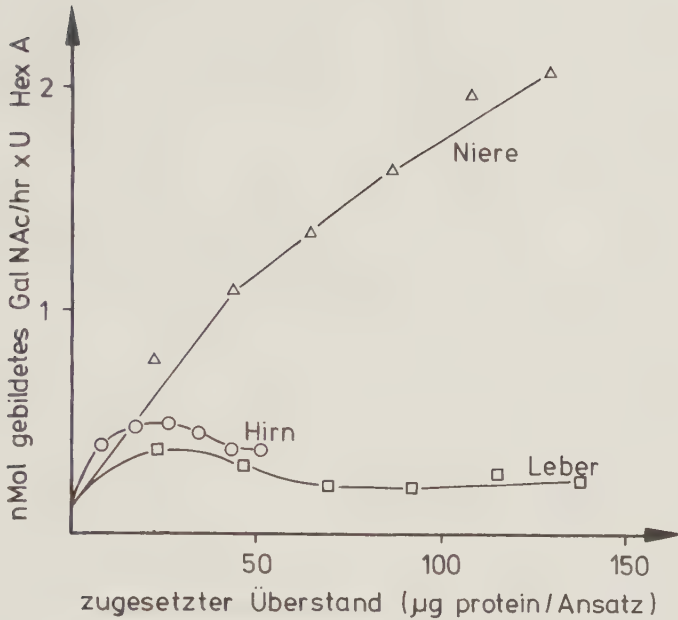


Abbildung 12: Stimulierung des enzymatischen Abbaus von Gangliosid G_{M2} durch Extrakte menschlicher Gewebe

10 %ige Extrakte der Gewebe in destilliertem Wasser wurden zur Inaktivierung der darin enthaltenen Hexosaminidasen 1 Stunde auf 60°C erhitzt und abzentrifugiert. Aliquote der Überstände wurden mit 30 mU Hex A und 10 nMol im Galaktosaminanteil tritiertem Gangliosid G_{M2} inkubiert. Für jeden Wert wurde zusätzlich ein Kontrollansatz ohne Hex A mitgemessen und abgezogen.

auf Eis aufbewahrter Proben verglichen (Abb. 13a). Während die Hexosaminidasen bei 60°C fast vollständig inaktiviert wurden, blieb der Aktivator bei dieser Temperatur noch stabil. Die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung bei 60°C (Abb. 13b) zeigt, daß einstündiges Erhitzen auf diese Temperatur ausreichte, um praktisch alle Hexosaminidase zu zerstören, wohingegen der Aktivator nach dieser Zeit noch vollständig aktiv war.

Da mit der Hexosaminidase auch ein großer Teil der anderen Proteine denaturiert und präzipitiert wird, wurde diese thermische Inaktivierung bei 60°C als erster Reinigungsschritt (nach der Extraktion) in der präparativen Isolierung des Aktivators eingesetzt. Die Extrakte wurden dazu 1 Stunde auf 60°C erhitzt, ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und verworfen.

Die weitgehend lineare Abhängigkeit des Gangliosidabbaus von der Aktivatorkonzentration (s.u.) erlaubte die Quantifizierung der Aktivatormenge anhand der gemessenen Aktivierung und die Definition einer Aktivator-Einheit:

Als 1 Aktivator-Einheit (1 AE) wurde diejenige Menge an Aktivator definiert, die unter den Standard-Bedingungen (0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, 37°C und eine Substrat-Menge von 10 nMol in einem Inkubationsvolumen von 40 µl) den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die Hexosaminidase A um 1 nMol/hr und Enzymeinheit Hexosaminidase A steigert.

Der Hitzeschritt ergab bei 100 % Ausbeute eine 2,6-fache Anreicherung.

3.2.3. Säurefällung

Nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß der Aktivator auch mehrtägige Dialysen gegen Puffer mit pH 4,0 in der Kälte ohne Verluste übersteht, wurde als nächster Schritt eine Säurefällung eingesetzt: Dazu wurde der Überstand der Hitzefällung in der Kälte (4°C) mit 1 M Citronensäure auf pH 4,0 titriert (dazu waren wegen der geringen Pufferkapazität des Wasserextraktes nur etwa 6 mMol/l erforderlich), 1 Stunde gerührt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand zur weiteren Verarbeitung gegen neutralen Phosphat-Puffer dialysiert. Dabei fiel noch einiges Protein aus, das ebenfalls abzentrifugiert und verworfen wurde.

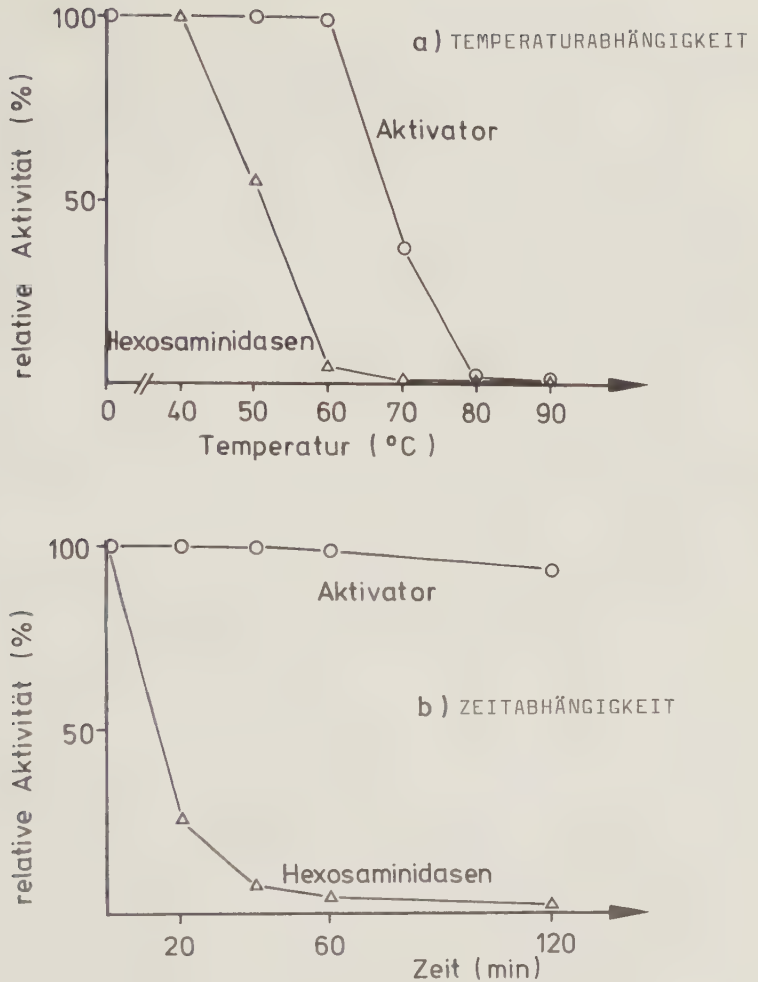


Abbildung 13: Thermische Stabilität menschlicher Hexosaminidase und des Aktivators für den Abbau des Gangliosids G_{M2}

Aliquote eines 10 %igen wässrigen Nierenextraktes wurden für 60 min. auf die angegebenen Temperaturen, bzw. für die angegebenen Zeiten auf 60°C erhitzt, dann zentrifugiert. Der Hexosaminidasegehalt der Überstände wurde mit 4-MüF-GlcNAc als Substrat bestimmt. 20 µl eines jeden Überstandes wurden eingesetzt, um die Aktivierung des Abbaus von Gangliosid G_{M2} durch Hex A zu messen (Standard-Ansatz mit 10 nMol Substrat, 65 mU Hex A; 3 Std. 37°C). Die entsprechenden Werte des unbehandelten Extraktes (0,84 U Hex A/ml und Aktivierung des Gangliosidabbaus um 0,32 nMol Gangliosid G_{M2} /Std. x U Hex A) wurden jeweils = 100 % gesetzt.

Insgesamt ergab dieser Schritt eine 1,7-fache Anreicherung bei mehr als 90 % Ausbeute.

3.2.4. Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Zellulose

Der hitze- und säurebehandelte, gegen 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,0, dialysierte Nierenextrakt wurde auf eine DEAE-Zellulose-Säule gegeben, die zuvor im gleichen Puffer äquilibriert worden war. Nach gründlichem Nachwaschen wurde mit einem NaCl-Gradienten (0 - 0,5 M) in 4 Säulenvolumina des gleichen Puffers eluiert. Der Aktivator wurde quantitativ auf der Säule gebunden und eluierte bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,12 M (Abb. 14).

Eine Bilanzierung der DEAE-Chromatographie ergab eine Ausbeute von etwa 75 % der eingesetzten Aktivator-Aktivität. Der Anreicherungsfaktor betrug für die vereinigten Hauptfraktionen 5,6 (von 14,7 auf 82,4 AE/mg Protein).

3.2.5. Gelfiltration an Biogel P 200 - Scheinbare Auftrennung des Aktivators in zwei Komponenten

Die aktivatorhaltigen Fraktionen der DEAE-Chromatographie wurden ohne vorherige Dialyse gefriergetrocknet und in einem kleinen Volumen destillierten Wassers aufgenommen. Nach Abzentrifugieren etwaiger unlöslicher Bestandteile wurde der klare Überstand in dünnem Phosphat-Puffer über eine Säule mit Biogel P 200 (Biorad, München) aufgetrennt. Wie in Abb. 15 dargestellt, war zunächst keine der erhaltenen Fraktionen in der Lage, den Gangliosidabbau im Testansatz nennenswert zu stimulieren. Wurde jedoch dem Inkubationsansatz neben einem Aliquot der auf den Aktivatorgehalt zu prüfenden Fraktion noch eine gleich große Menge einer der proteinreichsten Fraktionen zugefügt, so konnte die aktivierende Eigenschaft in einer niedermolekularen, proteiarmen Fraktion wiedergefunden werden. Umgekehrt gab der Zusatz dieser Fraktion zum Ansatz, zusätzlich zu den anderen Fraktionen, einen entsprechenden Gipfel der Aktivierungskapazität im höhermolekularen Bereich. Offensichtlich war also der Aktivator in 2 Komponenten aufgetrennt worden: Die höhermolekulare, im Diagramm mit " α " bezeichnet, lag in einem Bereich, der auf ein Molekulargewicht zwischen

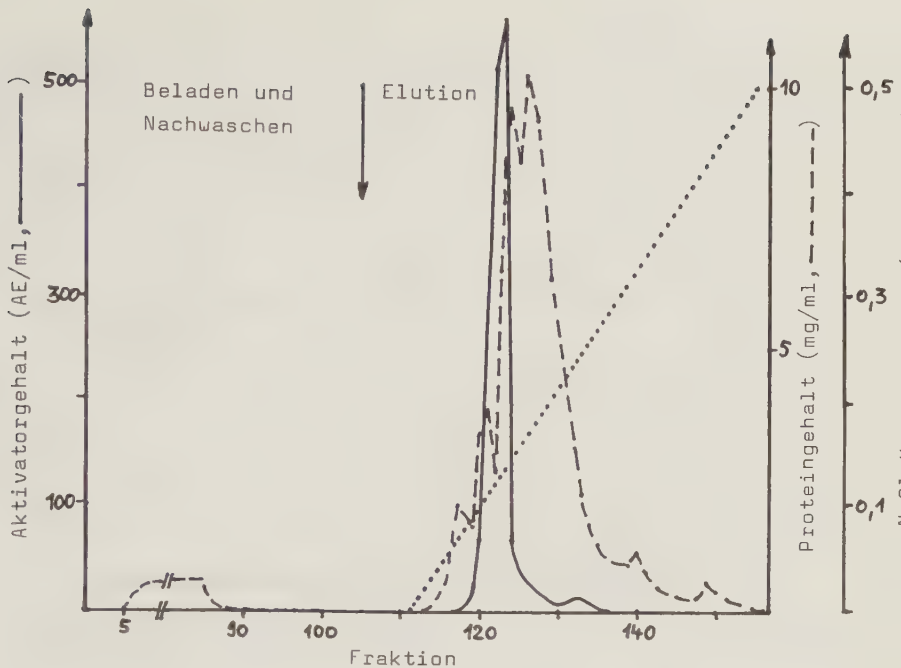


Abbildung 14: Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Zellulose

Hitzeinaktivierter Nierenextrakt (1,6 l), gegen 2 Wechsel à 40 l 10mM Phosphat-Puffer, pH 6,0, dialysiert (2,67 g Protein), wurde auf eine 250-ml-Säule mit dem gleichen Puffer äquilibrierter DEAE-Zellulose beladen. Nach dem Nachwaschen mit 2 Säulenvolumina desselben Phosphat-Puffers wurde die Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 - 0,5 M im gleichen Puffer eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 20 ml. Aliquote der Fraktionen wurden im enzymatischen Test auf ihre Fähigkeit geprüft, den Abbau von Gangliosid G_{M2} durch Hexosaminidase A zu stimulieren.

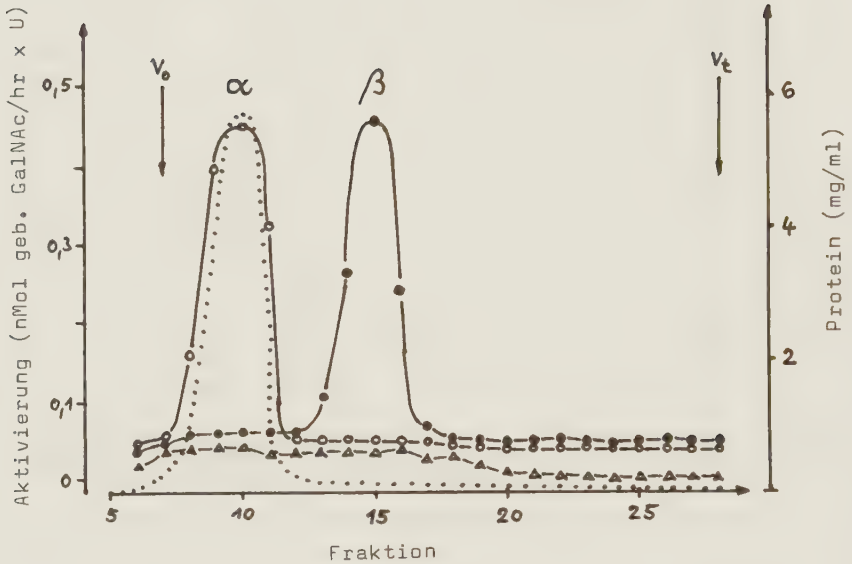


Abbildung 15: Auftrennung des Aktivators in 2-Komponenten durch Gelfiltration

Die aktivatorhaltigen Fraktionen der DEAE-Zellulose-Säule wurden durch Gefriertrocknen und Aufnahmen in 20 ml dest. Wasser konzentriert und mit einer Durchflußrate von 5 - 10 ml/hr über eine 450 ml-Säule mit Biogel P 200 in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 6,2, mit 25 mM NaCl chromatographiert. Fraktionen à 20 ml wurden gesammelt.

..... Proteingehalt

▲—▲—▲ Aktivierung des durch Hexosaminidase A katalysierten Gangliosid G_{M2} -Abbaus durch 10 μ l der jeweiligen Fraktion

●—●—● Aktivierung des Gangliosid-Abbaus durch 10 μ l der jeweiligen Fraktion in Gegenwart weiterer 10 μ l der Fraktion 10

○—○—○ Aktivierung des Gangliosid-Abbaus durch 10 μ l der jeweiligen Fraktion in Gegenwart weiterer 10 μ l der Fraktion 15

V_0 : Ausschuß-Volumen (Dextranblau 2000)

V_t : Salz-Volumen (bestimmt mit ^3H -Leucin)

60 000 und 80 000 schließen ließ und ungefähr mit dem Protein-Gipfel zusammenfiel; die niedermolekulare, "β", deren Position einem Molekulargewicht von 25 000 entsprach (beide Zahlen sind geschätzt, da diese Säule nicht exakt geeicht wurde, vgl. 3.3.2.), erschien dagegen weit hinter dem Hauptgipfel des Proteins, in einem relativ proteinarmen Bereich.

3.2.6. Untersuchungen zur Funktion der höhermolekularen Komponente

An dieser Stelle erschien es zweckmäßig, sich zunächst Klarheit zu verschaffen über die Funktion jeder der beiden Komponenten. Als erstes wurde dazu untersucht, ob und inwieweit eine von ihnen durch andere Proteine mit ähnlicher Funktion ersetzt werden kann. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl der Aktivator der Cerebrosid-Sulfatase als auch der von Li und Mitarbeitern (1973) für den Gangliosid-Abbau beschriebene Aktivator die höhermolekulare Komponente α zu ersetzen vermochten (Abb. 16). Überraschenderweise zeigte auch käufliches Rinderserumalbumin denselben Effekt. Alle drei Proteine waren allein praktisch wirkungslos, stimulierten aber zusammen mit der niedermolekularen Fraktion β den Gangliosidabbau ebenso wie eine rohe Präparation der α -Komponente.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Funktion der Fraktion α nicht auf einem bestimmten, darin enthaltenen Protein beruht; vielmehr kann diese Funktion auch von anderen Proteinen übernommen werden.

Weitere Hinweise auf die Natur dieses Effekts ergaben sich aus der Substratabhängigkeit des Gangliosidabbaus bei verschiedenen Albuminkonzentrationen (Abb. 17a). So aktiviert die niedermolekulare Komponente β bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen auch in Abwesenheit von Albumin oder anderen Fremdproteinen. Bei Erhöhung der Substratkonzentration beobachtet man jedoch einen steilen Abfall dieser Aktivierung, vergleichbar einer Substrathemmung. In Gegenwart von Albumin tritt diese scheinbare Substrathemmung erst bei wesentlich höheren Substratkonzentrationen auf.

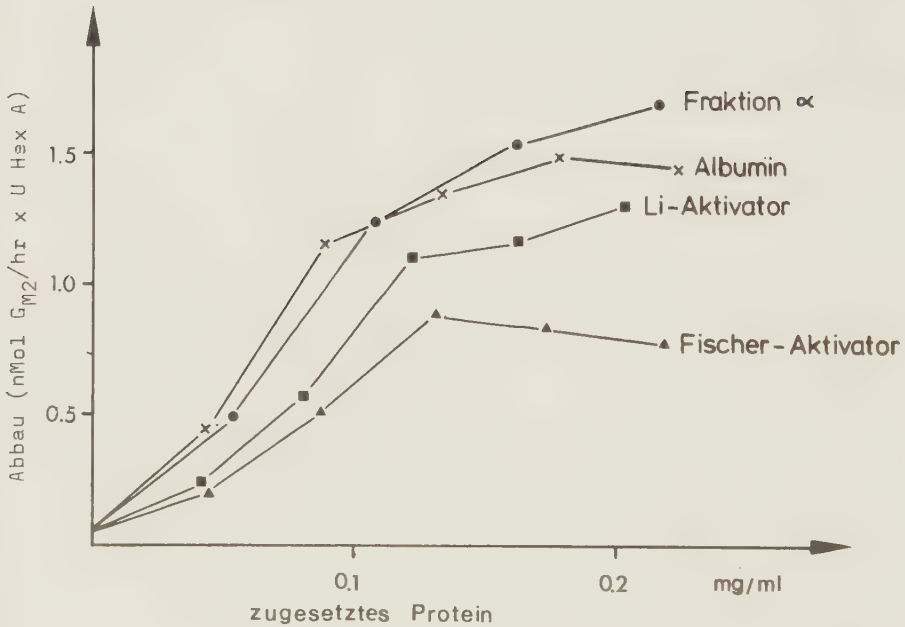


Abbildung 16: Ersetzbarkeit der "höhermolekularen Komponente", α , durch andere Proteine

Zu einem Standard-Ansatz von 10 nMol Gangliosid G_{M2} in 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, mit 0,1 U Hex A wurden 10 μ l der Komponente β und die auf der Abszisse angegebenen Mengen von verschiedenen anderen Proteinen zugegeben. Nach der Inkubation (2 Std.) wurde das gebildete GalNAc wie unter Material und Methoden beschrieben abgetrennt und anhand seiner Radioaktivität bestimmt.

Fischer-Aktivator: Aktivator der Cerebrosidsulfatase

Li-Aktivator: Aktivator der Gangliosid G_{M1} - β -Galaktosidase

Albumin: Rinderserumalbumin

Wird als Substrat statt des Gangliosids G_{M2} dessen sialsäurefreies Analogon G_{A2} eingesetzt, so tritt diese Substrathemmung nicht auf (Abb. 17b), daher zeigt auch der Zusatz von Albumin keine Wirkung.

Für die Funktion der α -Fraktion bietet sich somit eine einfache physikochemische Erklärung an: Jedes Gangliosid-Molekül enthält eine N-Acetylneuraminsäure, die beim pH-Wert des Inkubationsansatzes weitgehend dissoziiert und damit negativ geladen sein dürfte. Jede Gangliosid-Mizelle trägt deswegen eine größere Anzahl negativer Ladungen und bindet daher - ähnlich wie ein Ionenaustauscher - positiv geladene Proteine. Zu diesen zählen bei pH 4,2 sowohl der Aktivator (der in der β -Fraktion enthalten ist; isoelektrischer Punkt s. Abschn. 3.2.7. und 3.3.3.) als auch die Hexosaminidase A. Beide werden unspezifisch an der Oberfläche der Mizellen adsorbiert und damit immobilisiert. Größere Mengen von Fremdprotein, wie z.B. Albumin, verdrängen Aktivator und Enzym von der Mizelloberfläche, so daß beide wieder für den Gangliosidabbau zur Verfügung stehen. Mit dem neuraminsäurefreien und daher ungeladenen Asialosubstrat G_{A2} treten diese Effekte nicht auf.

Der mit " α " bezeichnete Faktor ist also keine spezifische Komponente des Aktivators, sondern kann wahrscheinlich durch nahezu alle Proteine, deren isoelektrischer Punkt über 4 liegt, ersetzt werden. Das eigentliche Aktivator-Protein ist in der niedermolekularen Fraktion β enthalten.

3.2.7. Weitere Reinigung des eigentlichen Aktivatorproteins durch präparative Elektrophorese mit anschließender isoelektrischer Fokussierung

Nach Gelfiltration wurden alle Fraktionen, die das Aktivatorprotein enthielten, vereint, gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Im Falle geringer Proteinkonzentration wurde zur Stabilisierung 0,1 mg Cytochrom C/ml zugesetzt. Das Lyophilisat wurde im Puffer des Trenngels aufgenommen (5 ml) und auf eine präparative Polyacrylamid-Flachgel-Disc-Elektrophorese im System von Williams und Reisfeld (1964) beladen. Zur Lokalisierung der Aktivatorbande im Gel nach dem Lauf wurde eine Probe der Ausgangslösung mit radioaktiv markiertem Glykolipid G_{A2} versetzt und in einer getrennten Bahn im selben Gel mit-

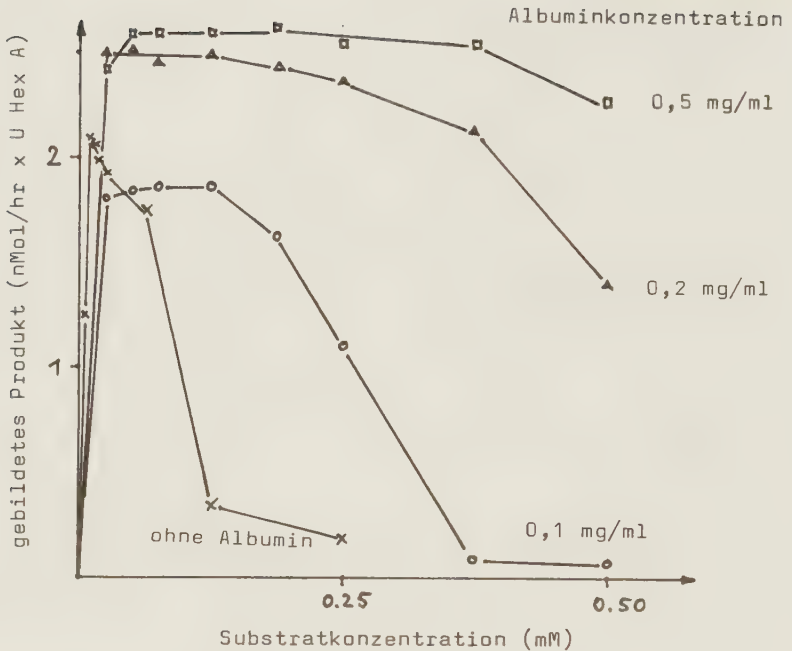


Abbildung 17a: Substratabhängigkeit der Gangliosid G_{M2} -Spaltung bei verschiedenen Albuminkonzentrationen

Inkubationsansätze von insgesamt 40 μ l mit 0,1 U Hex A, 10 μ l der Fraktion B der Gelfiltration (Abschn. 3.2.5.) und den angegebenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin und Gangliosid G_{M2} wurden für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte G_{M2} GalNAc wurde wie unter Material und Methoden beschrieben vom Substrat abgetrennt und quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

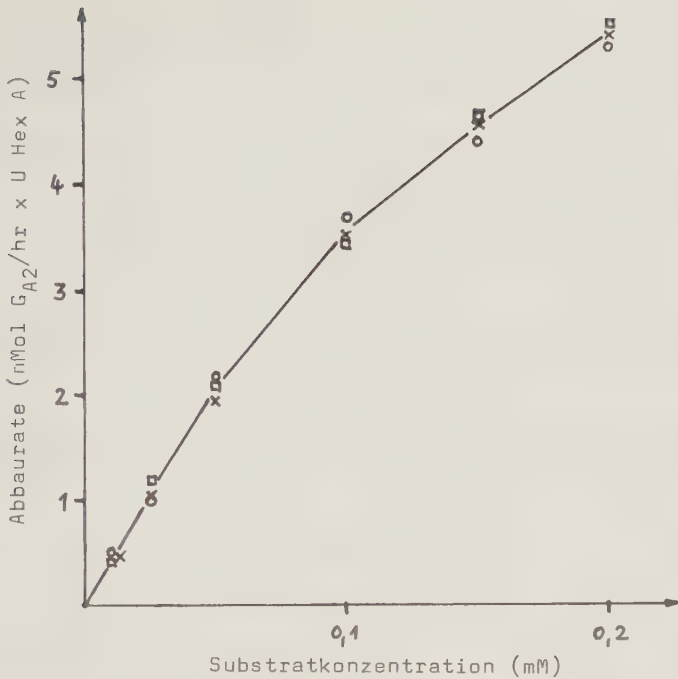


Abbildung 17b: Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung des Glykolipids G_{A2} von der Substratkonzentration

Ansätze von 100 μ l mit 0,1 U Hex A, 25 μ l der Fraktion β der Gelfiltration und den angegebenen Konzentrationen an Glykolipid G_{A2} und Rinderserumalbumin wurden 1 Std. bei 37°C inkubiert. Produkt (G_{A3}) und Substrat wurden nach dünnschichtchromatischer Trennung anhand ihrer Radioaktivität quantifiziert und daraus der Abbau berechnet. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

- ohne Albumin
- x—x 0,2 mg Alb./ml
- 0,5 mg Alb./ml

elektrophoriert. Nach dem Lauf wurde diese seitliche Bahn abgetrennt, in kleine Abschnitte zerteilt und deren Radioaktivität gemessen. Im Bereich der Aktivatorbande stieg die Radioaktivität aufgrund des mittransportierten Substrats stark an (Abb. 18).

Aus dem übrigen Gel wurde ein der so bestimmten Wanderungsstrecke entsprechendes Segment herausgeschnitten und durch isoelektrische Fokussierung extrahiert:

Dazu wurde der Gelstreifen in ein vorbereitetes Bett von Sephadex G 75 eingelegt, das mit einer Ampholin-Lösung des pH-Bereichs 4 - 6 getränkt war (s. Material und Methoden für den genauen Versuchsaufbau). An die beiden Schmalseiten des Gelbettes wurde eine Gleichspannung angelegt. Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Gelbett mit einem Fraktioniergitter entlang der Richtung des pH-Gradienten zerteilt und in jeder Fraktion mit einer Oberflächen-Elektrode der pH-Wert bestimmt. Die Abschnitte mit pH-Werten zwischen 4,3 und 5,3 wurden einzeln in kleine Säulen überführt und mit Citrat-Puffer eluiert. Abbildung 19 zeigt die Aktivierung des Gangliosid-Abbaus durch Aliquote der jeweiligen Eluate und die pH-Werte der Gelfraktionen. Neben der Extraktion des Polyacrylamidgels mit gleichzeitiger Konzentrierung der Probe und einem weiteren Reinigungsschritt liefert diese Methode auch die Information über den isoelektrischen Punkt des Aktivator-Proteins (4,8).

Die relativ niedrige Ausbeute dieses Verfahrens von etwa 10 - 12 % des eingesetzten Aktivators (Tabelle 5) beruht zum Teil wahrscheinlich auf der Kontamination des Präparats mit störenden Substanzen, die im nächsten Schritt (s.u.) abgetrennt werden, zum Teil wohl auch auf Verlusten bei der Gefriertrocknung. Der Anreicherungsfaktor kann wegen der Störung der Proteinmessung durch Ampholine nicht bestimmt werden.

3.2.8. Hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose

Die durch isoelektrische Fokussierung gewonnenen aktivatorhaltigen Fraktionen wurden auf eine kleine, mit demselben Citrat-Puffer äquilibrierte Octyl-Sepharose-Säule (Pharmacia, Schweden) gegeben. Nach kurzem Nachwaschen mit Phosphat-Puffer pH 6,0 wurde der Aktivator mit einer

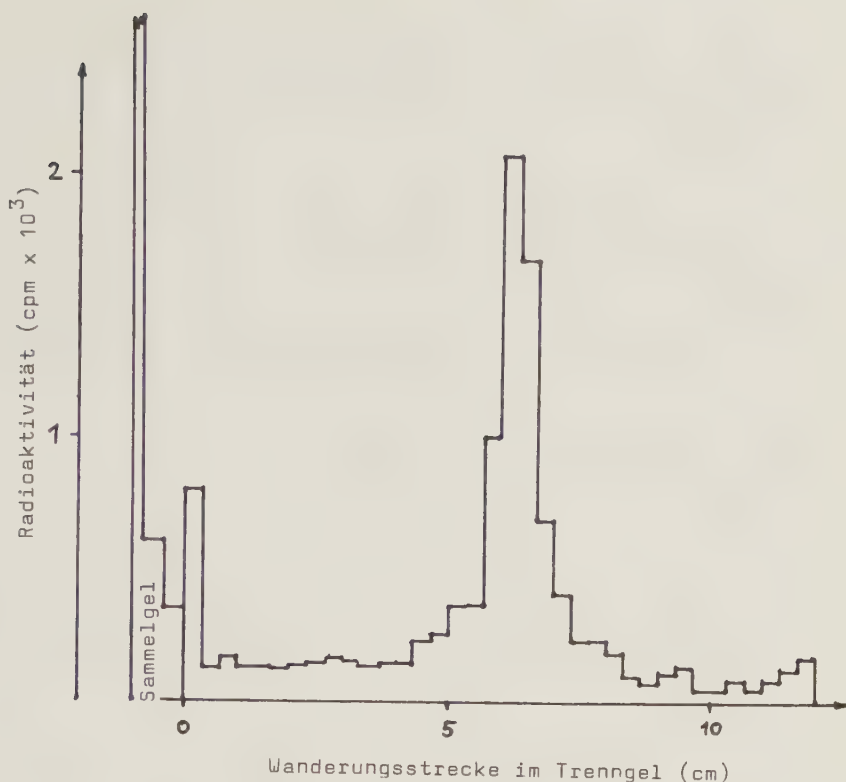


Abbildung 18: Lokalisation der Aktivatorbande nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein Aliquot von 50 μ l der Ausgangslösung wurde mit 2,5 nMol tritiummarkiertem Glykolipid G_{A2} versetzt und in die seitliche Tasche des Sammelgels gegeben. Nach dem Lauf wurde die entsprechende Bahn abgetrennt und in 0,3 cm lange Abschnitte zerteilt. Jedes Gelstückchen wurde zerkleinert, in ein Zählgläschen überführt und mit 10 ml Szintillator-Lösung ("Unisolve 100", Fa. Zinsser, Frankfurt/Main) versetzt und seine Radioaktivität gemessen.

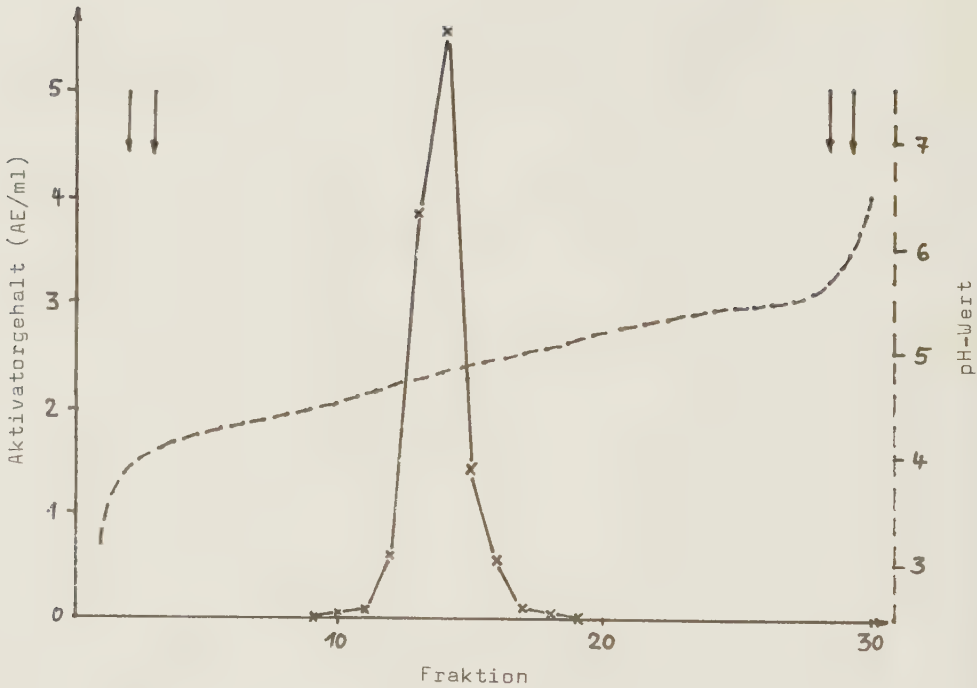


Abbildung 19: Extraktion des Aktivators aus dem Polyacrylamidgel durch isoelektrische Fokussierung

Der den Aktivator enthaltende Gelstreifen der präparativen Elektrophorese wurde in ein vorbereitetes Bett aus mit 5 %iger Ampholin-Lösung des pH-Bereichs 4 - 6 getränktem Sephadex G-75 transferiert. Die Fokussierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers der entsprechenden Ausrüstung (LKB, Schweden). Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Gelbett in Richtung des pH-Gradienten fraktioniert und in jeder Fraktion mit einer Oberflächen-Elektrode der pH-Wert gemessen. Die Abschnitte wurden in Säulen überführt und mit je 5 ml Citrat-Puffer eluiert. In den Eluaten wurde der Aktivatorgehalt bestimmt.

———— Aktivatorgehalt

- - - - - pH-Wert



Position des Polyacrylamidgel-Streifens

Lösung von 2 % (w/v) Na-Cholat im gleichen Puffer eluiert. (Der pH-Wechsel ist wegen der Unlöslichkeit der Cholsäure im Sauren notwendig.) Die Elutionsfraktionen wurden gegen destilliertes Wasser dialysiert und dann auf ihren Aktivatorgehalt geprüft.

Der Verlauf von Protein- und Aktivatorgehalt in den Fraktionen (Abb. 20) zeigt, ebenso wie eine analytische Elektrophorese der Aktivatorpräparate vor und nach der hydrophoben Chromatographie (Abb. 21), daß dieses Verfahren sehr gut geeignet ist, den Aktivator von kontaminierenden Begleitproteinen und insbesondere von den Trägerampholyten ("Ampholine") abzutrennen.

Die Ausbeute liegt (wohl wegen der bereits genannten Abtrennung störender Substanzen) für diesen Schritt allein bei 270 %. Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung und hydrophobe Chromatographie zusammen ergeben eine 3,7-fache Anreicherung bei 30,5 % Ausbeute.

Trägt man eine größere Menge der reinsten Fraktion auf eine diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese im System von Williams und Reisfeld (1964) auf, so erhält man nach Elektrophorese und Anfärbung eine diffuse Protein-Bande mit einer geringen, schneller wandernden Unreinheit (Abb. 22). Aus den dem R_f -Wert der Bande entsprechenden Segmenten einer (nicht angefärbten) Nachbar-Bahn ließ sich ein Teil des Aktivators wieder extrahieren. Wurde der Aktivatorprobe vor dem Lauf etwas radioaktives Glykolipid G_{A2} zugesetzt, so wurde das Lipid zum Teil ebenfalls an die Stelle des Aktivators transportiert (Abb. 22).

Die Unschärfe der Protein-Bande ist wohl nicht auf Mängel des elektrophoretischen Systems zurückzuführen (vgl. Abb 21, Bahn 1), sondern beruht wahrscheinlich auf einer Mikroheterogenität des Aktivators, wie sie auch für den Aktivator der Cerebrosid-Sulfat-Sulfatase ausführlich beschrieben wurde (Fischer, 1977).

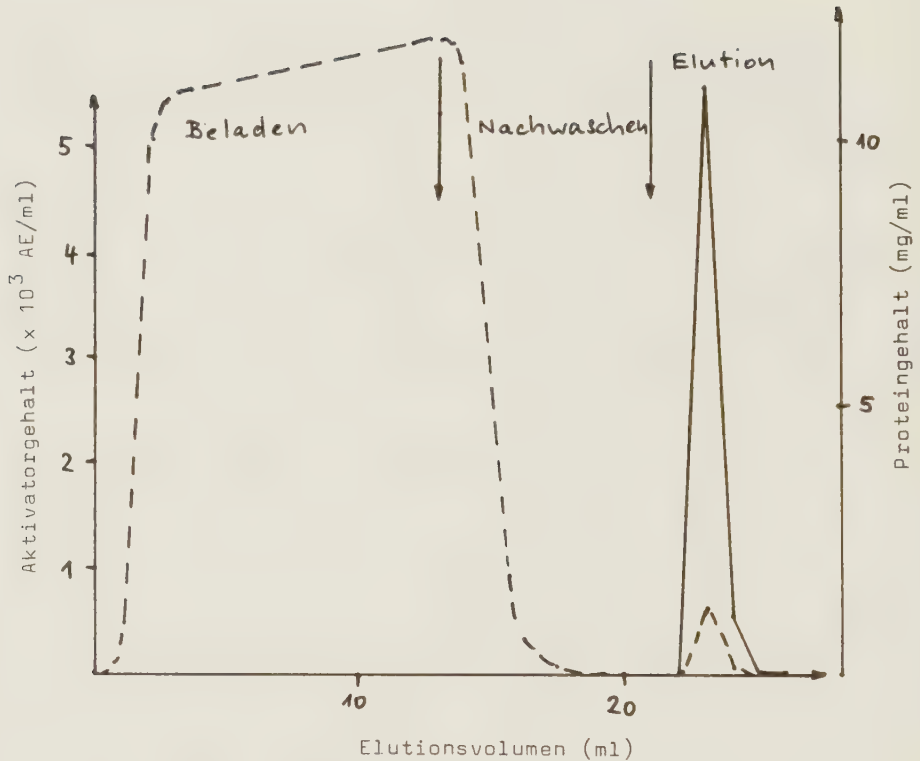


Abbildung 20: Hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose 4 B

Die aktivatorhaltigen Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung wurden auf eine kleine (1 ml) Säule von mit dest. Wasser gewaschener Octyl-Sepharose 4 B beladen. Die Säule wurde mit 10 ml 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,0, nachgewaschen und 20 mg Natriumcholat/ml im selben Puffer eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Zur Entfernung des Cholats wurden die Elutionsfraktionen über Nacht gegen dest. Wasser dialysiert. In allen Fraktionen wurde das Protein bestimmt (Lowry et al., 1951) sowie deren Fähigkeit, den enzymatischen Abbau des Gangliosids G_{M2} zu stimulieren.

--- Protein
— Aktivator



Abbildung 21: Elektrophoretische Verfolgung der Aktivator-Anreicherung

Auf 4 nebeneinanderliegenden Bahnen einer Polyacrylamid-Flachgel-Elektrophorese im diskontinuierlichen Puffer-System von Williams und Reisfeld (1964) (5 %-Gel, s. Material und Methoden) wurden aufgetragen:

Bahn 1: 90 μ g Protein nach DEAE-Zellulose-Chromatographie

Bahn 2: 15 μ g Protein nach Gelfiltration (Biogel P 200)

Bahn 3: 50 μ l der vereinten Fraktionen nach isoel.

Fokussierung

Bahn 4: 6 μ g Aktivator nach der hydrophoben Chromatogr.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in 12 %iger Trichloressigsäure fixiert und mit Coomassie Brilliant Blue auf Protein angefärbt. Die vor dem Aktivator laufende Färbung in Bahn 3 ist auf die Ampholine zurückzuführen.

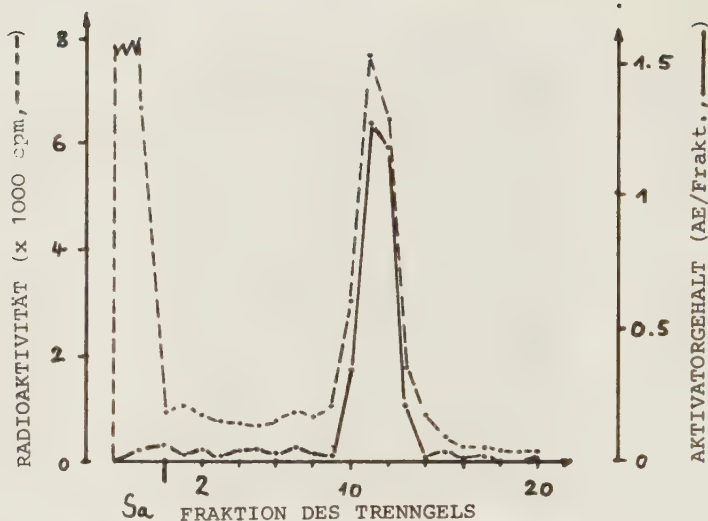


Abbildung 22: Identifizierung des Aktivators nach Elektrophorese

Auf 4 nebeneinanderliegende Bahnen einer Polyacrylamid-Flachgel-Elektrophorese (System Williams und Reisfeld, 1964; 5 %-Gel) wurden folgende Proben aufgegeben:

- Bahn 1: 25 µg Aktivator
- Bahn 2: 12,5 µg Aktivator
- Bahn 3: 12,5 µg Aktivator
- Bahn 4: 12,5 µg Aktivator + 2,5 nMol $^3\text{H-G}_{A2}$

Nach der Elektrophorese wurden Bahnen 1 und 2 auf Protein angefärbt (Coomassie Blue, unteres Foto). Bahn 3 wurde in 22 Segmente zerteilt und jedes einzeln eluiert (zerkleinert, 3 Tage in 50 mM Citrat-Puffer geschüttelt und zentrifugiert). Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Aktivatorgehalt geprüft. Bahn 4 wurde ebenfalls in 22 Segmente zerteilt und in jedem die Radioaktivität bestimmt (zerkleinert, 3 Tage in 10 ml Unisolve geschüttelt, dann gemessen).

Sa: Sammelgel

3.2.9. Bilanz der Anreicherung

Die Ausbeuten und Anreicherungsfaktoren der einzelnen Anreicherungsschritte sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Diese Daten wurden, wie allgemein üblich, auf das Homogenat bezogen. Im Verlauf der ersten Anreicherungsschritte stieg indessen die Ausbeute noch an, so daß angenommen werden muß, daß im Homogenat aufgrund der Anwesenheit inhibierender Substanzen nicht der volle Aktivatorgehalt gemessen werden konnte. Auf den Aktivatorgehalt der Stufe mit der höchsten Ausbeute (Hitzebehandlung, 124 %) bezogene Werte wurden daher für die letzte Stufe ebenfalls angegeben (Werte in Klammern).

3.3. Charakterisierung des Aktivators

3.3.1. Abbau durch Pronase P

Ein Aliquot einer teilgereinigten Aktivator-Präparation (nach Gelfiltration) wurde mit 0,5 mg der bakteriellen Protease Pronase P aus *S. griseus* über Nacht bei 37°C und pH 6,5 inkubiert (Nomoto et al., 1960). Unter diesen Bedingungen verlor der Extrakt seine Fähigkeit, den Abbau des Gangliosids G_{M2} zu stimulieren, vollständig. Daß die bei saurem pH-Wert inaktive Protease den enzymatischen Gangliosidabbau selbst nicht stört, zeigte ein Kontrollversuch, bei dem die Protease erst nach der Inkubation bei pH 6,5, unmittelbar vor der Messung des Gangliosidabbaus, zugegeben wurde.

3.3.2. Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht des Aktivators wurde bestimmt durch Gelfiltration an Sephadex G-100 (Andrews, 1964) (Abb. 23). Der Aktivator eluierte etwa in denselben Fraktionen wie Chymotrypsinogen, er besitzt also ebenfalls ein Molekulargewicht um 25 000 Dalton. (Allerdings ist bei diesem Verfahren eine Verzögerung der Elution durch eine Wechselwirkung zwischen Protein und Gelmatrix nicht ganz auszuschließen, d.h., das Molekulargewicht kann in Wirklichkeit auch etwas größer sein.)

Tabelle 5: Bilanz der Aktivator-Anreicherung

Anreicherungs-Schritt	Aktivator AE*1	Protein mg	spez. Akt. AE/mg	Ausbeute %	Anreicherungs- faktor
Homogenat	35 000	22 000	1,6	100	1
Extrakt	43 000	13 120	3,3	123	2,1
Hitzebehandlung	43 450	5 056	8,6	124	5,4
Säurefällung	40 250	2 737	14,7	115	9,2
DEAE-Zellulose	29 600	360	82	84,6	52
Gelfiltration	18 000	15	1 200	51,4	755
Elektrophorese/ isoel. Fokuss.	2 030	—*2	—	5,8	—
Hydrophobe Chrom.	5 500	1,25	4 400	15,7 (12,7)*3	2 770 (2 230)*3

*1 Zur Definition der Aktivator-Einheit (AE) s. Abschn. 3.2.2.

*2 Die Proteinmessung erfaßt auch den hohen Gehalt an Trägerampholyten ("Ampholine"), ein Anreicherungsfaktor kann daher auf dieser Stufe nicht angegeben werden.

*3 Berechnet unter der Annahme, daß die nach Hitzebehandlung gemessene Aktivatormenge bereits im Homogenat vorhanden war, aber wegen der gleichzeitigen Anwesenheit störender Substanzen nicht voll gemessen werden konnte.

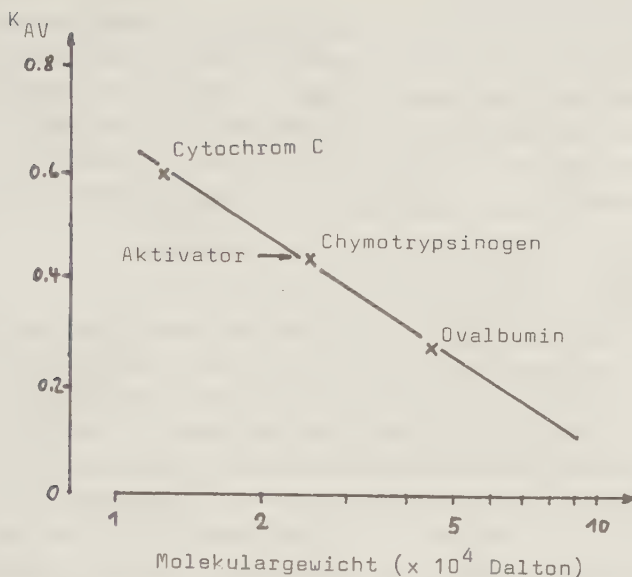


Abbildung 23: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G-100

Eine Sephadex G-100 Säule (25 x 600 mm) wurde mit 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,0, mit 0,15 M NaCl ("PBS") äquilibriert und mit folgenden Testsubstanzen geeicht: 2 mg Dextranblau 2000 (MG 2 000 000), 1 mg Cytochrom C (MG 12500), 2 mg Chymotrypsinogen (MG 25 000), 2 mg Ovalbumin (MG 45 000) und 0,2 mg tritiiertes Leucin (MG 131; etwa 300 000 cpm). Auftragsvolumen: 2 ml; Durchflußrate: 1 ml/min (12 cm/hr). Fraktionen von 5 ml wurden gesammelt und ihre Radioaktivität (Leucin), ihre Extinktion bei 620 nm (Dextranblau) und bei 400 nm (Cytochrom C) sowie ihr Proteingehalt (nach Lowry et al., 1951) gemessen.

Der Gipfel des Dextranblaus markiert das Ausschlußvolumen (V_0), der des Leucins das Salzvolumen (V_t). Der für jedes Eichprotein ermittelte Wert

$$K_{AV} = \frac{V_s - V_0}{V_t - V_0}$$

(V_s = Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins) ergibt, gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen, näherungsweise eine Gerade.

Zur eigentlichen Messung des Molekulargewichts des Aktivators wurde eine Probe mit 2 mg Dextranblau, 1mg Cytochrom C, 0,2 mg [3H]-Leucin und 220 AE des Aktivators in 2 ml PBS auf derselben Säule unter den gleichen Bedingungen chromatographiert. Aliquote der Fraktionen wurden dann auf ihre Fähigkeit, den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A zu stimulieren, getestet.

3.3.3. Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Fokussierung im Dichtegradienten in einer "Mini-Elektrofokussiersäule" nach Harzer (1970) konzentrierte den Aktivator in einer Fraktion mit einem pH-Wert von 4,8. Derselbe isoelektrische Punkt ergab sich auch aus den isoelektrischen Fokussierungen in granulierten Gelen im Anschluß an die präparative Elektrophorese (Abschn. 3.2.7.).

3.3.4. Isoenzym- und Substratspezifität

In den folgenden Versuchen wurde die Spezifität der Hexosaminidasen A und B gegenüber den drei Lipidsubstraten, Gangliosid G_{M2} , Glykosphingolipid G_{A2} und Nierenglobosid, in Gegenwart des Aktivatorproteins bestimmt. In Abb. 24 sind die jeweils erzielten Abbauraten in Abhängigkeit von den eingesetzten Aktivatorkonzentrationen dargestellt.

Dabei fällt zunächst die nahezu ausschließliche Spezifität des Aktivators für die Hexosaminidase A auf. Das Isoenzym B vermochte auch bei hohen Aktivatorkonzentrationen keines der eingesetzten Substrate nennenswert abzubauen.

Dieser Befund erklärt, warum bei Patienten der Variante B der G_{M2} -Gangliosidose, bei denen nur die Hexosaminidase A defekt ist, (vgl. Kapitel 4), eine massive Speicherung von Glykolipiden auftritt.

Vergleicht man allerdings die Umsatzraten der drei Glykolipide durch Hexosaminidase B untereinander, (Abb 24d), so erkennt man, daß das Glykolipid G_{A2} durch dieses Isoenzym immer noch etwa 10 - 15 mal schneller umgesetzt wird als die beiden anderen Lipidsubstrate.

Damit werden auch die quantitativen Unterschiede in den Lipidspeichermustern der Varianten O und B verständlich: Während das Gangliosid G_{M2} bei beiden Varianten praktisch nicht abgebaut wird, kann das Glykolipid G_{A2} bei der Variante B zumindest noch langsam gespalten werden, so daß dessen Speicherung bei den Patienten dieser Krankheit geringer ausfällt als bei denen der Variante O.

Der Abbau des wasserlöslichen Substrats 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid sowohl durch Hexosaminidase A als auch durch Hexosaminidase B wird durch das Aktivatorprotein weder gesteigert noch behindert (o. Abb.).

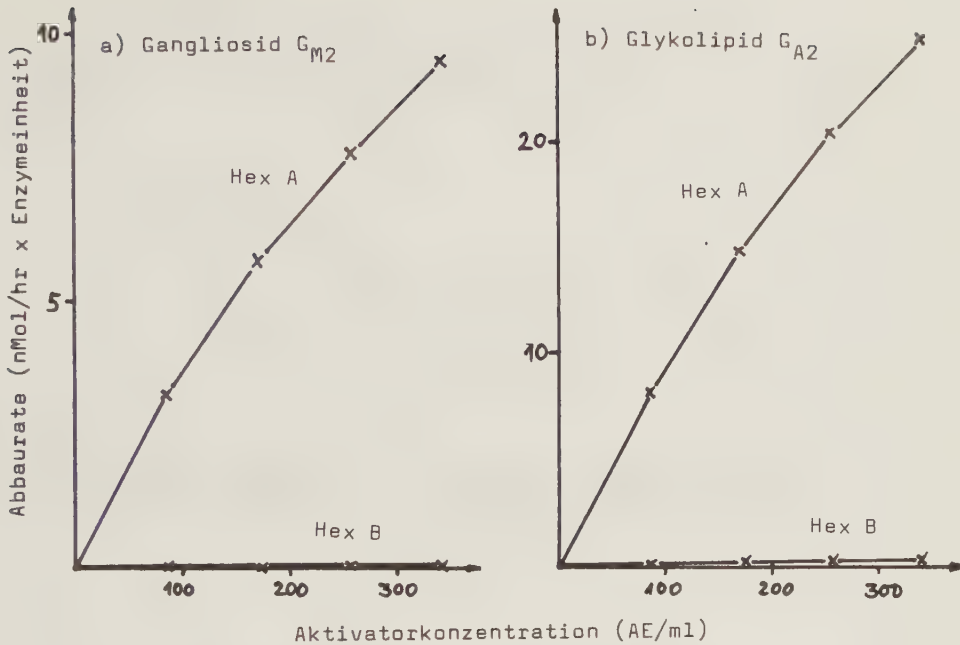
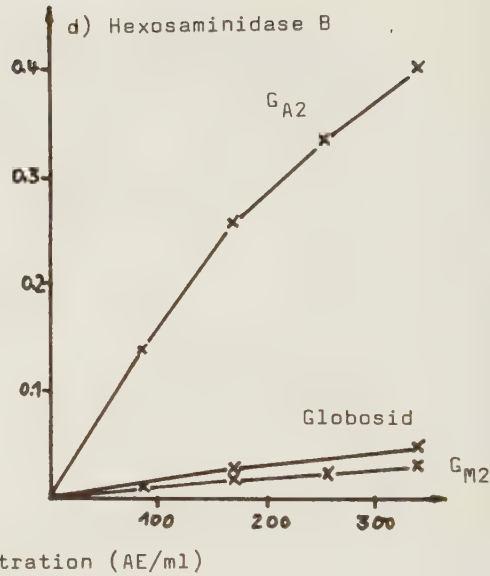
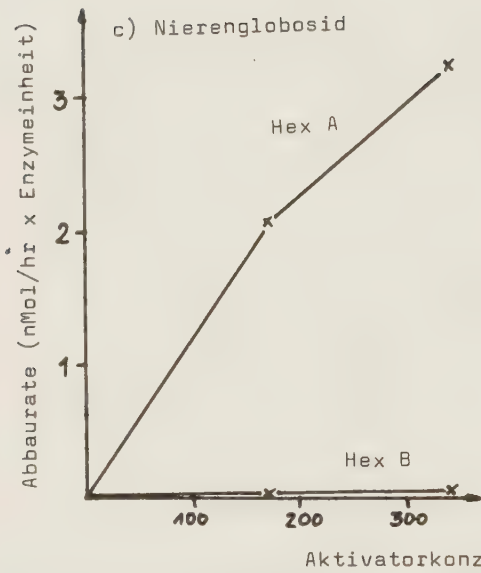


Abbildung 24: Abbau verschiedener Glykosphingolipide durch die Hexosaminidasen A und B in Gegenwart des Aktivators

a) Gangliosid G_{M2} : 10 nMol im Galaktosamin-Anteil ^3H -markiertes Gangliosid G_{M2} wurden mit 0,1 U Hex A oder 1 U Hex B, 20 μg Rinderserumalbumin und den angegebenen Konzentrationen an Aktivator 1 Std. bei 37°C inkubiert (Standard-Ansatz).
b) Glykolipid G_{A2} : 12,5 nMol tritiiertes Glykolipid G_{A2} wurden mit 0,1 U Hex A oder 3,34 U Hex B und 50 μg Rinderserumalbumin sowie den angegebenen Konzentrationen an Aktivator für 1 Std. bei 37°C inkubiert.



c) Nierenglobosid: Ansätze von insgesamt 0,1 ml 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,2 mit 0,65 U Hex A oder 3,34 U Hex B, 10 nMol tritiummarkiertem Globosid und den angegebenen Konzentrationen an Aktivator wurden 1 Std. bzw. 5 Std. (Hex B) bei 37°C inkubiert.

d) Zusammenfassung der Daten für Hexosaminidase B aus den Abb. a) - c) in vergrößertem Maßstab.

3.3.5. pH-Optimum

Der optimale pH-Wert für die enzymatische Hydrolyse von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} durch Hexosaminidase A in Gegenwart des Aktivators liegt, wie Abb. 25 zeigt, bei pH 4,2.

3.3.6. Kinetiken

3.3.6.1. Zeitabhängigkeit

Die Spaltung des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidase A steigt in Gegenwart einer konstanten Menge des Aktivatorproteins bis 4 Stunden linear mit der Inkubationszeit an (Abb. 26). Auch mit Glykolipid G_{A2} als Substrat wurde eine lineare Zeitabhängigkeit erhalten (nicht abgebildet).

3.3.6.2. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Der Gangliosidabbau steigt bei konstanter Menge an Aktivator und konstanter Inkubationsdauer mit der eingesetzten Enzymmenge bis 0,6 U Hexosaminidase A (15 U/ml) linear an (Abb. 27). Dies gilt auch für das Glykolipid G_{A2} (nicht abgebildet).

3.3.6.3. Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Die Abhängigkeit des Umsatzes der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch die Hexosaminidase A von der Substratkonzentration ist für eine konstante Aktivatorkonzentration bereits aus Abb. 17 a und b (Abschn. 3.2.5.) ersichtlich. Abb. 28 zeigt entsprechende Abhängigkeiten für weitere Konzentrationen des Aktivatorproteins.

In Gegenwart genügender Mengen an Fremdprotein (Rinder-serumalbumin) steigt der Abbau des Gangliosids G_{M2} schon bei geringen Substratkonzentrationen sehr rasch an, um dann ein Plateau zu erreichen. Nimmt man für den Mechanismus der Aktivierung das auch für diesen Fall sehr wahrscheinliche Modell von Fischer und Jatzkewitz (1978) an (s. 3.1.), so deutet dieses Verhalten auf eine sehr starke Bindung des Gangliosids an den Aktivator, d.h., daß schon bei geringen Lipidkonzentrationen der Aktivator fast vollständig gesättigt ist und daß durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration keine Steigerung der Konzentration an Aktivator-Substrat-Komplex und damit der Umsatzgeschwindigkeit mehr

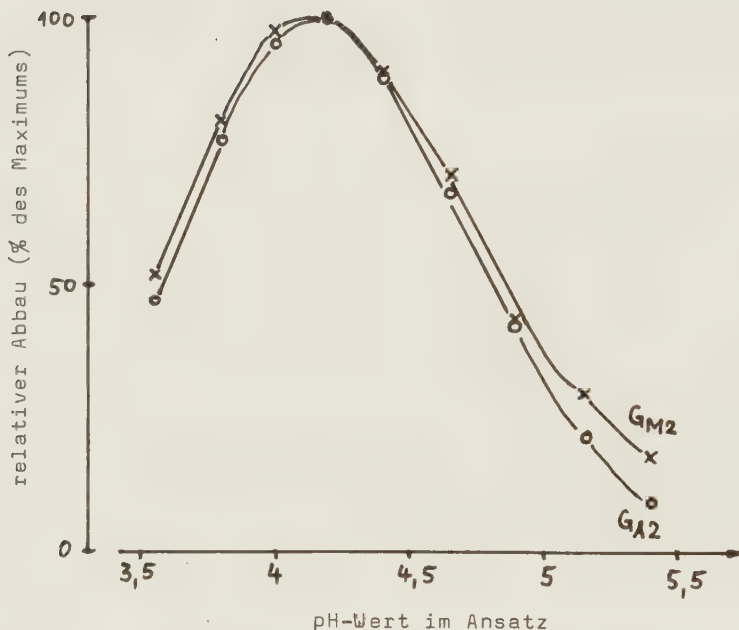


Abbildung 25: pH-Abhängigkeit des Abbaus der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch die Hexosaminidase A

a) Gangliosid G_{M2} : Im Galaktosamin-Anteil tritiummarkiertes Gangliosid (10 nMol) wurde mit 0,1 U Hex A, 20 μ g Rinder-serumalbumin und 3,5 AE Aktivator für 1 Std. in 40 μ l 0,1 M Citratpuffer des angegebenen pH-Wertes bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte Galaktosamin wurde wie beschrieben (Material und Methoden) gemessen.

b) Glykolipid G_{A2} : Das im Sphingosinanteil 3 H-markierte Substrat (12,5 nMol) wurde mit 0,5 U Hex A, 50 μ g Rinder-serumalbumin und 8,8 AE Aktivator (teillgereinigte Präparation) in 0,1 ml 0,1 M Citrat-Puffer des angegebenen pH-Wertes 1 Std. bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde wie unter Material und Methoden angegeben bestimmt.

Um die Verschiebung des pH-Wertes durch die Verdünnung des Puffers im Ansatz (ca. 0,2 - 0,4 pH-Einheiten in Richtung neutraler Werte) zu erfassen, wurden Ansätze ohne Substrat hergestellt und deren tatsächlicher pH-Wert gemessen. (Mikro-elektrode der Fa. Radiometer, Kopenhagen). Alle Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

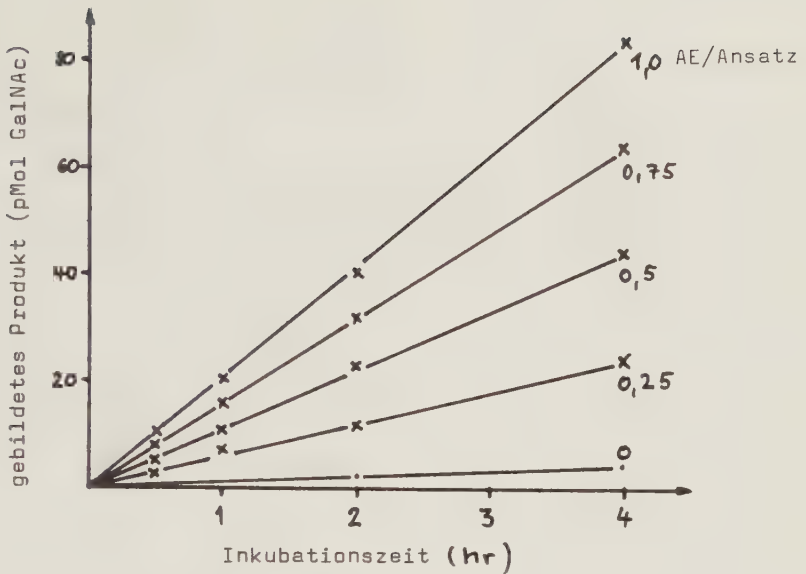


Abbildung 26: Zeitabhängigkeit des durch Hexosaminidase A katalysierten Gangliosid G_{M2} -Abbaus in Gegenwart des Aktivators

Standard-Ansätze von 40 μ l 0,1 M Citratpuffer, pH 4,2, mit 10 nMol im Galaktosamin-Anteil markiertem Gangliosid G_{M2} , 20 μ g Rinderserumalbumin, 0,1 U Hex A und den angegebenen Mengen an Aktivatorprotein wurden für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

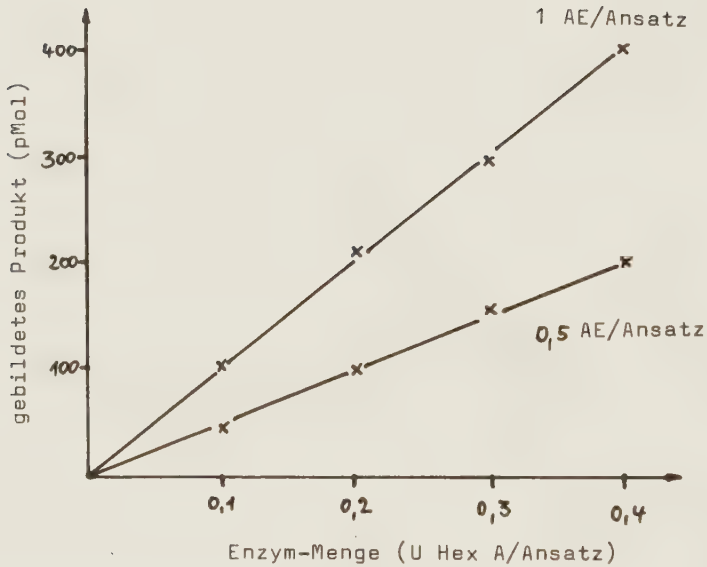


Abbildung 27: Abhängigkeit des Gangliosid-Abbaus von der Enzymmenge

Standard-Ansätze von 40 μ l 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, mit 10 nMol tritiummarkiertem Gangliosid G_{M2} , 20 μ g Rinder-serumalbumin und 0,5 bzw. 1 AE Aktivator sowie den angegebenen Mengen an Hexosaminidase A wurden 1 Std. bei 37°C inkubiert und das freigesetzte GalNAc wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

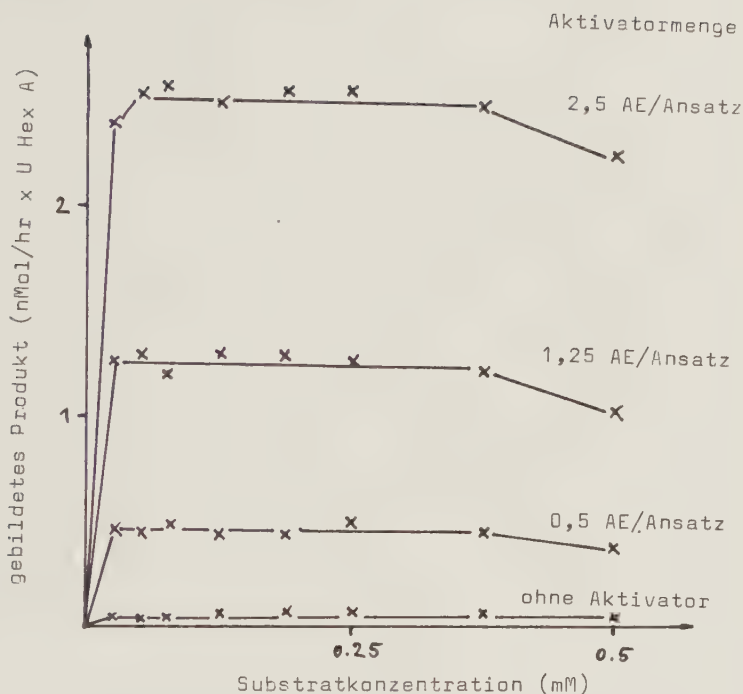


Abbildung 28a: Abhängigkeit des Abbaus von Gangliosid G_{M2} von der Substratkonzentration

Steigende Konzentrationen des im GalNAc-Anteil 3H -markierten Gangliosids G_{M2} wurden mit 0,1 U Hex A und den angegebenen Mengen an Aktivatorprotein sowie 20 μ g Rinderserumalbumin im Standardansatz von 40 μ l für 1 Std. bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Bestimmung des freigesetzten GalNAc erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

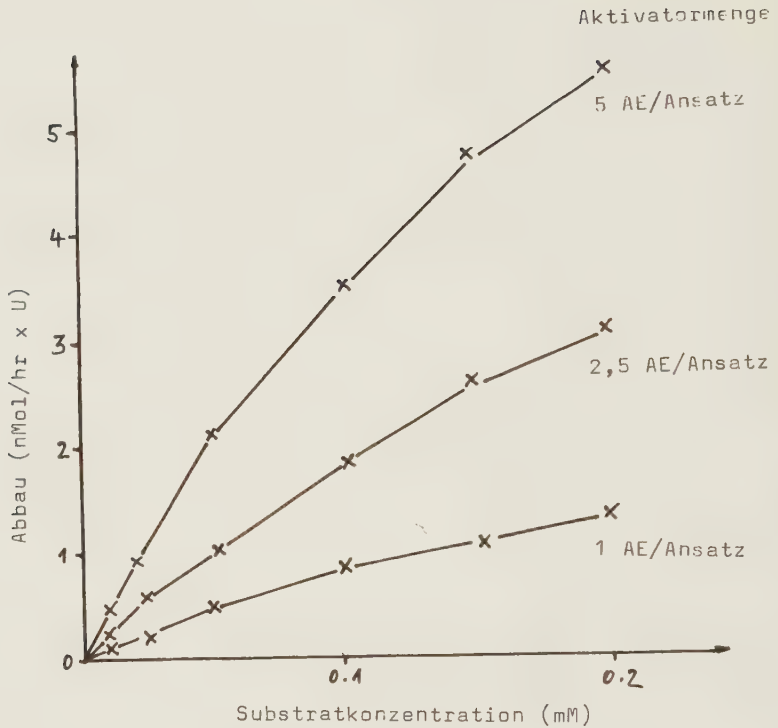


Abbildung 28b: Abhängigkeit des Abbaus von Glykolipid G_{A2} von der Substratkonzentration

Die angegebenen Konzentrationen an im Sphingosin-Anteil markiertem Glykolipid G_{A2} wurden mit 0,5 U Hex A und den ebenfalls angegebenen Mengen an Aktivatorprotein sowie 50 μ g Rinderserumalbumin in 0,1 ml Citrat-Puffer, pH 4,2, für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Messung des Abbaus ist unter Material und Methoden beschrieben.

erreicht werden kann.

Im Gegensatz dazu steigt der Umsatz an Glykolipid G_{A2} mit der Substratkonzentration verhältnismäßig langsam an; dies läßt auf eine relativ schwache Wechselwirkung zwischen G_{A2} und Aktivator schließen.

3.3.6.4. Abhängigkeit von der Aktivatorkonzentration

Die Abhängigkeit der Abbauraten der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} sowie des Nierenglobosids von der Konzentration des Aktivators bei konstanten Enzym- und Substratkonzentrationen ist bereits in Abb. 24 (Abschn. 3.3.4.) gezeigt. Die einer Sättigungskinetik nach Michaelis und Menten entsprechenden Kurvenverläufe im Falle der Hexosaminidase A (für die Hexosaminidase B sind die Streuungen wegen der geringen Abbauwerte zu groß für eine Beurteilung) sind ein weiteres Indiz dafür, daß das Fischer-Jatzkewitz-Modell auch für diesen Aktivator Gültigkeit besitzt:

Nach diesem Modell entsteht zunächst aus Aktivator-Molekül und Lipidmonomerem ein Komplex im Verhältnis 1 : 1, der nach dem Massenwirkungsgesetz mit den Ausgangssubstanzen im Gleichgewicht steht und für dessen Stabilität die Dissoziationskonstante K_S ein Maß darstellt. Dieser Komplex ist das Substrat der dann folgenden Enzymreaktion.

Nimmt man an, daß die von Michaelis und Menten (1913) für den Umsatz löslicher Substrate aufgestellte Kinetik auch für diese Reaktion gilt, und zwar dergestalt, daß die Konzentration des Aktivator-Lipid-Komplexes an die Stelle der Substratkonzentration tritt (und damit die Michaelis-Konstante K_M die Wechselwirkung des Enzyms mit diesem Komplex beschreibt), so wird die zunächst komplex erscheinende Abhängigkeit der Umsatzraten von der Aktivator- bzw. der Substratkonzentration einer einfachen mathematischen Behandlung zugänglich:

Solange die Substratkonzentration $[S]$ die Aktivatorkonzentration $[A]$ weit übersteigt, gilt für die Umsatzgeschwindigkeit v :

$$v = v_{\max} \frac{[A][S]}{(K_S + [S])K_M + [A][S]}$$

($v_{\max}$ ist die theoretische Maximalgeschwindigkeit, K_S die Dissoziationskonstante des Aktivator-Substrat-Komplexes und K_M die Michaelis-Konstante für die Wechselwirkung des Enzyms

mit diesem Komplex. Die Ableitung dieser und der folgenden Gleichungen ist in Anhang 8.2. ausführlich beschrieben.)

Die Konstanten $V_{\max}$, K_S und K_M lassen sich für jedes Lipid mittels einer einfachen graphischen Methode aus den in Abhängigkeit von der Substrat- sowie der Aktivatorkonzentration bestimmten Umsatzraten ermitteln:

Trägt man zunächst im doppelt reziproken Diagramm nach Lineweaver und Burk (1934) $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[A]}$ auf ($[S] = \text{const.}$), so liegen die Werte auf einer Geraden, die die Ordinate bei $\frac{1}{v_{\max}}$ und die Abszisse bei $-\frac{[S]}{(K_S + [S])K_M}$

schneidet. (Wenn $[S] \gg K_S$ ist, so vereinfacht sich dieser Ausdruck zu $-\frac{1}{K_M}$.)

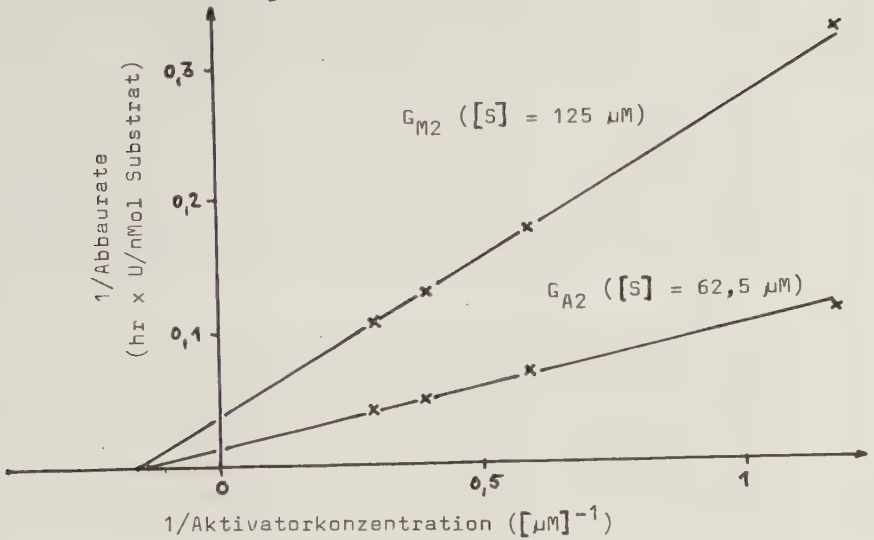
Anschließend trägt man $\frac{1}{v}$ bei konstantem $[A]$ in einem analogen Diagramm gegen $\frac{1}{[S]}$ auf. Auch diese Werte liegen theoretisch auf einer Geraden und zwar mit einem y-Achsenabschnitt von $\frac{1}{v_{\max}} \left(\frac{K_M}{[A]} + 1 \right)$ und einem x-Achsenabschnitt von $-\frac{K_M + [A]}{K_S \cdot K_M}$.

Da $[S]$ und $[A]$ jeweils vorgegeben wurden, also bekannt sind, erhält man 2 Gleichungen mit 2 Unbekannten, die sich leicht auswerten lassen.

Abb. 29 zeigt derartige doppelt reziproke Diagramme für den Abbau von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} durch Hexosaminidase A. Die Meßwerte liegen tatsächlich in guter Näherung auf Geraden, so daß die Gültigkeit des beschriebenen Modells für diese Reaktionen angenommen werden kann. Die quantitative Auswertung der Daten ergibt die in Tabelle 6 zusammengefaßten Werte.

Es bestätigt sich die bereits erwähnte Vermutung, daß das Gangliosid G_{M2} wesentlich stärker an den Aktivator gebunden wird als sein Asialoderivat G_{A2} . Offensichtlich besitzt das Aktivatorprotein eine spezielle Bindungsstelle für die im Gangliosid enthaltene N-Acetylneuraminsäure. Diese Neuraminsäure scheint andererseits die enzymatische Abspaltung des benachbarten N-Acetyl-D-galaktosaminrestes zu erschweren, was sowohl in der höheren Michaelis-Konstante und der niedrigeren Maximalgeschwindigkeit der vom Aktivator

a) Variation von $[A]$ bei konstantem $[S]$



b) Variation von $[S]$ bei konstantem $[A]$

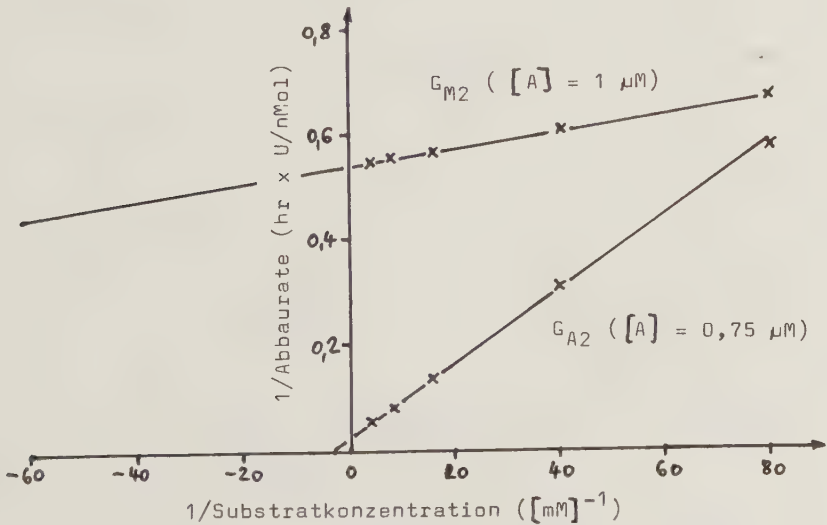


Abbildung 29: Doppelt reziproke Darstellung der Daten in Abb. 24 und 28.

Tabelle 6: Kinetische Parameter* für den Abbau von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} durch Hexosaminidase A in Gegenwart des Aktivatorproteins

Substrat	K_S	K_M	v_{max}
Gangliosid G_{M2}	3,5 μM	4,6 μM	13,5 $\frac{nMol}{hr \times U}$
Glykolipid G_{A2}	460 μM	0,9 μM	80 $\frac{nMol}{hr \times U}$

*berechnet unter der Annahme, daß 1 mg Aktivatorprotein etwa 4000 Aktivator-Einheiten entspricht.

K_S = Dissoziationskonstante des Aktivator-Substrat-Komplexes

K_M = Michaelis-Konstante von Hexosaminidase A für diesen Komplex

v_{max} = theoretische Maximalgeschwindigkeit

vermittelten Reaktion, als auch in den mit Detergens gemessenen Umsatzraten zum Ausdruck kommt (vgl. Tab. 4).

3.3.7. Nachweis des Substrat-Aktivator-Komplexes

Eine der wesentlichen Stützen für das Aktivator-Modell von Fischer und Jatzkewitz war der direkte Nachweis der Komplexbildung zwischen Substrat und Aktivator in der Elektrophorese (Fischer und Jatzkewitz, 1978).

Ein entsprechender Nachweis ließ sich auch für die Bindung von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} an den für ihren Abbau zuständigen Aktivator erbringen:

3.3.7.1. Glykolipid G_{A2}

In einer Polyacrylamid-Flachgel-Elektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem nach Williams und Reisfeld (1964) wurden nebeneinander aufgetragen:

- Glykolipid G_{A2} alleine
- Glykolipid G_{A2} und Aktivator
- Aktivator alleine

Nach dem Lauf wurden die Bahnen getrennt und jede Bahn einzeln in kleine Segmente zerschnitten. In Bahnen a) und b) wurde - nach entsprechendem Aufschluß - die Radioaktivitätsverteilung bestimmt, die Abschnitte der Bahn c) wurden mit

Citrat-Puffer eluiert (durch mehrtägiges Schütteln der zerkleinerten Gel-Stücke im Puffer und anschließende Zentrifugation) und der Aktivatorgehalt in den Eluaten gemessen. Abb. 30 zeigt die Verteilung von radioaktivem Substrat und vom Aktivator entlang der Laufrichtung der Elektrophorese. Ohne Aktivatorzusatz blieb das - elektrisch ungeladene - Lipid am Start liegen, während in Gegenwart des Aktivatorproteins ein Teil davon an eine Stelle transportiert wurde, an der auch der Aktivator wiederzufinden war.

3.3.7.2. Gangliosid G_{M2}

Die Gangliosid-Mizellen tragen bei neutralem pH-Wert eine hohe negative Oberflächenladung und wandern daher im Williams-Reisfeld-System so weit, daß sie mit der Bestimmung des Aktivator-Substrat-Komplexes interferieren. Eine dem obigen Versuch analoge Elektrophorese wurde deswegen in einem anderen Puffer-System (Reisfeld et al., 1962) bei pH 4 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wandern Gangliosid und Aktivator in verschiedene Richtungen, so daß bei entsprechender Polung nur der Aktivator bzw. dessen Komplex mit dem Lipid in das Gel einwandert. Das Resultat (nicht abgebildet) entsprach erwartungsgemäß dem mit dem Glykolipid G_{A2} : In Gegenwart des Aktivators war ein Teil des radioaktiv markierten Lipids beim R_f -Wert des Aktivators im Gel wiederzufinden.

3.3.8. Zusammenfassung

Die enzymatische Hydrolyse von Gangliosid G_{M2} , Glykolipid G_{A2} und Nierenglobosid durch gereinigte Hexosaminidasen erfolgt in vitro in Abwesenheit von Detergentien nur sehr langsam. Ähnlich anderen Abbaureaktionen von Glykolipiden durch wasserlösliche Hydrolasen kann auch diese Reaktion durch den Zusatz eines in menschlichen Geweben vorkommenden Kofaktors sehr stark beschleunigt werden. Dieser Aktivator ist, wie u.a. Versuche mit der bakteriellen Protease Pronase P zeigten, ein Protein, sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,8, sein Molekulargewicht wurde mittel Gelfiltration zu 25 000 Dalton bestimmt. Er ist temperaturstabil bis 60°C und verträgt in der Kälte pH-Werte bis hinunter zu pH 4.

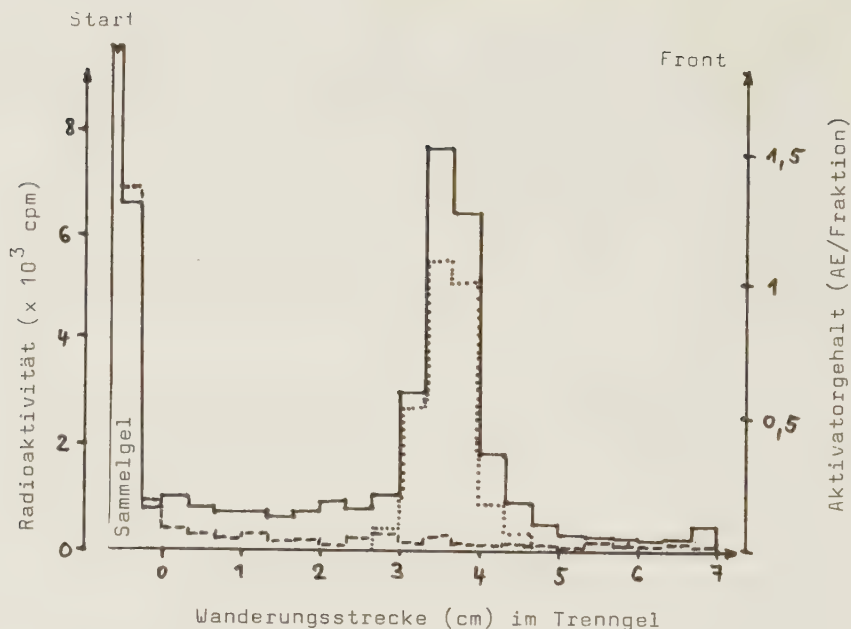


Abbildung 30: Elektrophoretischer Nachweis der Komplexbildung zwischen dem Aktivator und Glykolipid G_{A2}

In 3 benachbarten Bahnen einer Polyacrylamid-Flachgelelektrophorese nach Williams und Reisfeld (1964) wurden nebeneinander aufgetragen:

- 10 nMol 3H -markiertes Glykolipid G_{A2}
- 10 nMol 3H -markiertes Glykolipid G_{A2} und 25 AE Aktivator (teilweise gereinigtes Präparat)
- 25 AE Aktivator

Alle Proben waren im Sammelgelpuffer gelöst. Nach dem Lauf (2 Std., 10 mA/cm² Gelquerschnitt) wurden die Bahnen getrennt und in 0,5 cm-Stücke zerteilt. Die Segmente der Bahnen a) und b) wurden in Zählgläschen überführt, mit "Tissue solubilizer" (TS-1, Fa. Koch-Light, USA) aufgeschlossen und ihre Radioaktivität dann nach Zusatz von Szintillator-Flüssigkeit ("Unisolve 100", Fa. Zinsser, Frankfurt/Main) im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Abschnitte der Bahn c) wurden zerkleinert, mehrere Tage mit je 1 ml 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, bei Raumtemperatur geschüttelt und dann abzentrifugiert. Aliquote der Überstände wurden auf ihre Fähigkeit geprüft, den enzymatischen Abbau von Gangliosid G_{M2} zu aktivieren.

--- Radioaktivität in Bahn a)
 — Radioaktivität in Bahn b)
 Verteilung des Aktivators in Bahn c)

In elektrophoretischen Versuchen ließ sich zeigen, daß das Aktivatorprotein mit den Lipidsubstraten Komplexe bildet. Zusammen mit dem Befund, daß der Abbau des wasserlöslichen Substrats 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid durch den Aktivator nicht beeinflußt wird, deutet dies darauf hin, daß der Mechanismus der Aktivierung dem Fischer-Jatzkewitz-Modell für die Aktivierung des durch Arylsulfatase A katalysierten Abbaus von Cerebrosid-3-sulfat (Sulfatid) folgt: Nach diesem Modell bindet das Aktivator-Protein Monomere des Lipidsubstrats. Dieser Aktivator-Lipid-Komplex wird vom Enzym als Substrat erkannt und umgesetzt, während die vom Glykolipid in Abwesenheit von Aktivator bzw. Detergens gebildeten Mizellen aufgrund ihrer dichten Packung für das Enzym nicht zugänglich sind.

Die nach diesem Modell theoretisch zu erwartenden Abhängigkeiten der Umsatzraten von der Substrat- bzw. Aktivatorkonzentration (Abschn. 3.3.6. und Anhang 8.2.) wurden für den Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch Hexosaminidase A auch tatsächlich gefunden; dies spricht ebenfalls für die Gültigkeit des Modells auch in diesem Fall..

Bemerkenswert ist ferner die hier zum ersten Mal demonstrierte Isoenzym-Spezifität des Aktivators: Der Aktivator-Lipid-Komplex bindet spezifisch nur an die Hexosaminidase A, während das Isoenzym Hexosaminidase B den Komplex fast nicht umsetzen kann. Das bedeutet, daß die Substratspezifität der Isoenzyme in vivo vom Aktivator bestimmt wird. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Befunden bei verschiedenen Varianten der G_{M2} -Gangliosidose (Kapitel 4).

4. Die Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose

4.1. Die Varianten der infantilen G_{M2} -Gangliosidose

Erbliche Defekte des Enzyms N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase (E.C. 3.2.1.30) führen zum Krankheitsbild der G_{M2} -Gangliosidose, einer Verlaufsform der infantilen amaurotischen Idiotie, die schon 1881 von Warren Tay (Tay, 1881) beschrieben wurde: Die an dieser Krankheit leidenden Kinder entwickeln sich zunächst normal, verlieren jedoch schon im ersten Lebensjahr bereits erworbene Fähigkeiten wie Aufsetzen, Greifen usw.. Später folgen Lähmungen der Gliedmaßen, Krämpfe und Blindheit. Charakteristisches Symptom ist der kirschrote Fleck im Augenfundus: Durch die degenerierte Ganglienzellschicht scheinen die Blutgefäße hindurch. Die Krankheit endet nach etwa 2 - 3 Jahren tödlich.

Für den Untergang der Nervenzellen verantwortlich ist eine massive Anhäufung des Gangliosids G_{M2} und seines Asialo-restes G_{A2} , welche beide im normalen Gehirn nur als Spurenkomponenten vorkommen, bei den Patienten jedoch 6 - 12 % des Hirntrockengewichts ausmachen (Sandhoff et al., 1971).

Durch den Ausfall des abbauenden Enzyms können diese Zwischenprodukte des Glykolipidstoffwechsels nicht weiter umgesetzt werden und häufen sich, da sie als Membranbestandteile auch nicht über die Körperflüssigkeiten abtransportiert und ausgeschieden werden können und andere Abbauege nicht existieren, im Organ ihrer Entstehung so lange an, bis dieses funktionsunfähig wird und der Patient stirbt.

Biochemisch lassen sich, je nach Art des der Krankheit zugrundeliegenden Enzymdefektes, mehrere Varianten unterscheiden (Sandhoff et al., 1971):

- a) Bei der Variante B, der "Tay-Sachs'schen Erkrankung", fehlt von den beiden hauptsächlich lysosomalen Hexosaminidase-Isoenzymen A und B das A-Enzym vollständig (Okada und O'Brien, 1969; Sandhoff, 1969). Auch immunologisch konnte kein kreuzreagierendes Protein nachgewiesen werden (Carroll und Robinson, 1973; Geiger et al., 1975). Im Nervengewebe kommt es zu einer massiven Speicherung der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} (Klenk et al., 1963; Svennerholm et al., 1963). Diese Form der Krankheit ist

vor allem unter den Juden osteuropäischer Herkunft (Ashkenazim) endemisch.

- b) Der Defekt der gemeinsamen Untereinheit (Beutler et al., 1975; Geiger und Arnon, 1976) führt zum gleichzeitigen Ausfall beider Isoenzyme A und B bei der Variante D (Sandhoff et al., 1968; Sandhoff und Harzer, 1973). Nur das Spurenenzym Hexosaminidase S ist noch nachweisbar. Typisch für diese Variante ist die zusätzliche Anhäufung des Nierenglobosids in den visceralen Organen. Außerdem fällt die Speicherung des Glykolipids G_{A2} im Hirn noch stärker aus als bei der B-Variante (Tabelle 3, Abschn. 2.3.).
- c) Im Gegensatz zu diesen Formen läßt sich bei der sehr selten auftretenden Variante AB kein Enzymdefekt nachweisen; vielmehr liegen in den untersuchten Organen die Enzym-Spiegel sowohl von Hexosaminidase A als auch von Hexosaminidase B in oder gar über der Norm (Sandhoff et al., 1971; Brett et al., 1973; de Baecque et al., 1975). Diese Enzyme unterscheiden sich auch in ihren Eigenschaften (Kinetik mit synthetischen und natürlichen Substraten, Hitzestabilität, elektrophoretisches Verhalten, isoelektrische Punkte, pH-Profile, immunochemisches Verhalten) nicht von normalen Hexosaminidasen (Conzelmann et al., 1978). Trotzdem zeigen diese Patienten klinisch fast die gleichen Symptome wie die Patienten der anderen Varianten, man findet im Nervengewebe eine massive Speicherung der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} und die Kinder sterben ebenfalls im Alter von etwa 3 Jahren.

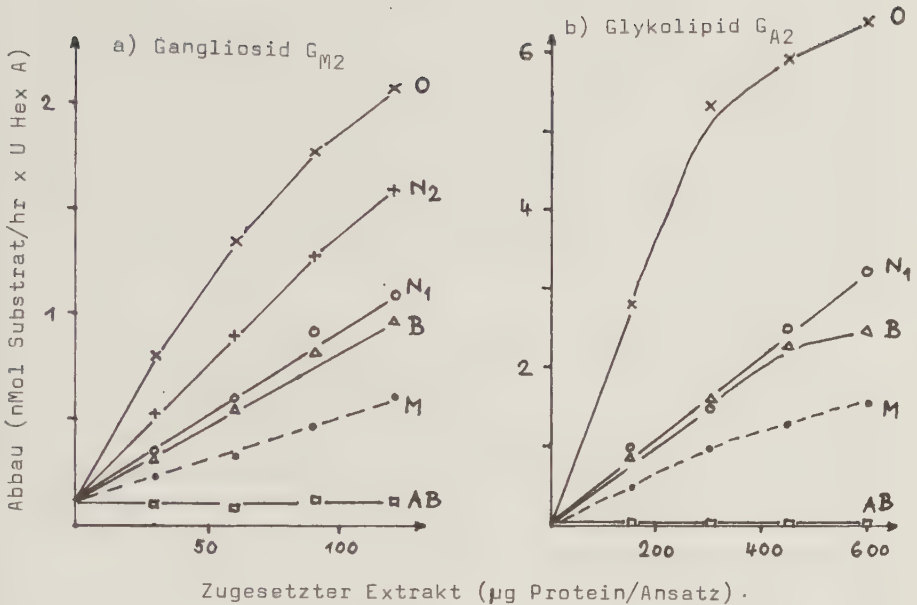
Die juvenilen und adulten Fälle, d.h., Fälle mit ähnlichen klinischen Symptomen, aber später einsetzendem und protrahiertem Krankheitsverlauf, die ebenfalls bekannt sind (z.B. Bernheimer und Seitelberger, 1968; Young et al., 1970; Brett et al., 1973; O'Brien, 1973; Rapin et al., 1976) lassen sich im Prinzip den Varianten B und D zuordnen. Soweit sie biochemisch untersucht wurden, zeigte sich - wie zu erwarten, daß die Hexosaminidase A durch die jeweilige Mutation in ihrer Aktivität stark beeinträchtigt, aber nicht völlig inaktiviert wird (Zerfowski und Sandhoff, 1974).

Während die Varianten O und B der G_{M2} -Gangliosidose - insbesondere im Lichte der in Abschn. 3.2. demonstrierten Abhängigkeit der Substratspezifitäten der Hexosaminidase-Isoenzyme von den Eigenschaften des Aktivatorproteins - durch den Ausfall der Hexosaminidase A erklärt werden können, fehlt eine solche Erklärung für die Variante AB. Nachdem eine Mutation der Hexosaminidase A, dergestalt, daß das Enzym noch synthetische, wasserlösliche, aber nicht mehr die natürlichen Substrate zu erkennen und abzubauen vermag, ausgeschlossen werden konnte, liegt, angesichts der im vorangehenden Kapitel beschriebenen Existenz eines Aktivatorproteins für den Abbau von Glykolipiden durch dieses Enzym, die Arbeitshypothese eines Defekts eben dieses Aktivatorproteins als Ursache der Variante AB nahe. Dieser Hypothese soll im folgenden nachgegangen werden.

4.2. Nachweis des Aktivatordefekts bei einem Fall der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose

Der Aktivator für den enzymatischen Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch Hexosaminidase A läßt sich, wie in Abschn. 3.2.1. beschrieben, am leichtesten in wässrigen Nierenextrakten nachweisen. Es ist daher zu erwarten, daß sich ein eventueller Defekt dieses Aktivators ebenfalls am ehesten in Extrakten aus Nierengewebe demonstrieren läßt. Nachdem von einem der wenigen in der Literatur erwähnten Patienten dieser Krankheitsform (Brett et al., 1973; als "case of G_{M2} gangliosidosis, hexosaminidases A and B normal") tiefgefrorenes postmortales Nierengewebe zur Verfügung stand, konnte der entsprechende Versuch unternommen werden.

Dazu wurden kleine Proben dieses Gewebes sowie entsprechender Kontrollen (normalen Nieren und solchen von Patienten, die an den anderen Varianten der G_{M2} -Gangliosidose verstorben waren) in destilliertem Wasser homogenisiert und abzentrifugiert. Die Überstände wurden für 1 Stunde auf 60°C erhitzt und ausgefallenes Protein wiederum abzentrifugiert. Die verbliebenen klaren Überstände wurden auf ihre Fähigkeit getestet, den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch gereinigte Hexosaminidase A zu stimulieren. Abb. 31 zeigt den Einfluß steigender Mengen derartiger Extrakte auf den Gangliosid-Abbau im Standard-Inkubationsansatz mit Hexosaminidase A.



Abbildungung 31: Aktivierung des durch Hexosaminidase A katalysierten Abbaus des Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch normale und pathologische menschliche Nierenextrakte

Proben menschlicher Nieren normalen oder pathologischen Ursprungs wurden mit dest. Wasser extrahiert. Die Extrakte wurden 1 Std. auf 60°C erhitzt, dann abzentrifugiert.

a) Steigende Mengen der Extrakte wurden mit 65 mU reiner Hex A und 10 nMol Gangliosid G_{M2} in einem Gesamtvolumen von 40 μl 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,2 3 Std. bei 37°C inkubiert, danach wurde das freigesetzte GalNAc wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

b) Die angegebenen Extraktmengen wurden mit 0,2 U reiner Hex A und 10 nMol Glykolipid G_{A2} in insgesamt 0,2 ml 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, für 3 Std. bei 37°C inkubiert und der Abbau des Glykolipids nach den beschriebenen Methoden gemessen.

- N_1 : Normale Kontrolle 1
- +—+ N_2 : " " 2
- ×—× O: Variante O
- △—△ B: " B
- AB: " AB
- M: Mischung der Extrakte N_1 und AB

Extrakte aus normalen Nieren wie auch solche aus Nieren der Varianten B und D vermochten den Abbau sowohl des Gangliosids G_{M2} als auch des Glykolipids G_{A2} abhängig von der eingesetzten Proteinmenge enorm zu steigern, wohingegen der Extrakt aus dem Nierengewebe des an der Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose verstorbenen Patienten keinerlei Einfluß zeigte. Daß dies auf das Fehlen des Aktivators und nicht auf die Anwesenheit eines Inhibitors zurückzuführen ist, bewies der gleichzeitig durchgeführte Mischversuch (gestrichelte Linien in Abb. 31): Eine 1 : 1-Mischung des normalen mit dem AB-Extrakt aktivierte etwa halb so stark wie der Normal-extrakt allein.

Der nach der vorangegangenen Hitzeinaktivierung nahe-
liegende Einwand, daß der Aktivator bei der Variante AB
durchaus noch vorhanden, aber wesentlich hitzlabiler sein
könne, konnte durch ein entsprechendes Experiment mit den
Rohextrakten vor dem Hitzeschritt entkräftet werden (Abb. 32):

Steigende Mengen dieser Rohextrakte wurden mit Gangliosid
 G_{M2} und Hexosaminidase A inkubiert. Nach Abzug der in
vergleichbaren Ansätzen ohne zusätzliche Hexosaminidase
gemessenen Blindwerte ergab sich auch hier eine Stimulierung
des Gangliosidabbaus durch alle Extrakte außer dem der
Variante AB.

Beim Fehlen einer Enzymaktivität oder einer anderen
von Proteinen getragenen Funktion in tiefgefrorenen und
länger gelagerten Geweben ist stets auch die Möglichkeit
einer Schädigung des Proteins durch die lange Lagerung oder
durch Einfrieren und Auftauen in Betracht zu ziehen. Eine
solche Möglichkeit scheidet jedoch in diesem Fall praktisch
aus, da einige der Kontrollen noch länger unter denselben
Bedingungen (-70°C) gelagert wurden und selbst Gewebe, die
über 10 Jahre unter teilweise ungünstigen Verhältnissen
(-20°C , mit mehrfachem Auftauen zur Probenentnahme oder
durch Geräteschaden) aufbewahrt worden waren, noch eine
fast normale Aktivatormenge enthielten.

Es kann also als sicher gelten, daß zumindest dieser
Fall der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose durch
den Ausfall des Aktivatorproteins für den enzymatischen
Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} verursacht wird.

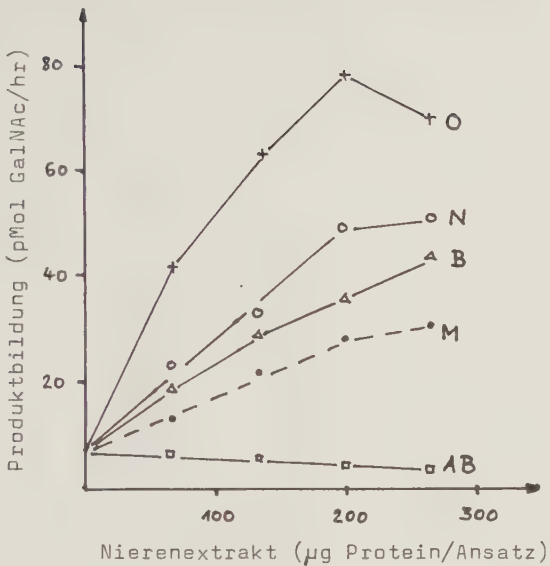


Abbildung 32: Stimulierung des Gangliosid-Abbaus durch rohe Nierenextrakte

Proben menschlicher Nieren normaler oder pathologischer Herkunft wurden mit 9 Vol. dest. Wasser homogenisiert und zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf). Steigende Mengen der Überstände wurden mit 10 nMol tritiummarkiertem Gangliosid G_{M2} und 65 mU Hex A in 40 µl 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,2, für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte GalNAc wurde wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen. Zu jedem Ansatz wurde ein Blindwert ohne zusätzliche Hexosaminidase gemessen und abgezogen. Alle Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

○—○ N: Normale Kontrolle

△—△ B: Variante B

+—+ O: Variante O

□—□ AB: Variante AB

·-·-· M: Mischung der Extrakte N und AB

4.3. Nachweis des Aktivatordefekts in kultivierten Hautfibroblasten eines weiteren Falls der Variante AB

Die im vorangehenden Abschnitt dargelegten Ergebnisse sprechen zwar eindeutig für einen Defekt des Aktivatorproteins als Ursache für die Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose, konnten jedoch, da diese Krankheitsform nur sehr selten auftritt, nur an diesem einen Fall gemessen werden. Es war daher wünschenswert, diese Resultate an einem zweiten Patienten dieser Variante zu bestätigen.

Ein solcher war von de Baecque et al. (1975) diagnostiziert und beschrieben worden. Da dieser Patient zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch lebte, standen zur biochemischen Untersuchung lediglich in Zellkultur weitergezüchtete Hautfibroblasten zur Verfügung.

Zunächst wurde analog zu den Experimenten mit Nierengewebe versucht, den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch gereinigte Hexosaminidase A in vitro durch Zusatz von Fibroblastenhomogenaten bzw. deren hitzeinaktivierte Überstände zu stimulieren, um auf diese Weise den Aktivatorgehalt in den Kontrollzellen zu quantifizieren und den Defekt des Aktivatorproteins in den Zellen des Patienten der Variante AB nachzuweisen. Diese Stimulierung fiel jedoch auch mit Normalzellen so gering aus, daß ein Defekt des Aktivators bei der Variante AB nicht mehr sicher nachzuweisen war.

Wesentlich bessere Aussagen ließen sich aufgrund der Abbauraten des Gangliosids G_{M2} durch die Extrakte selbst treffen: Dazu wurden Rohextrakte der Zellen mit Gangliosid G_{M2} unter Zusatz von Detergens (TDC) oder Aktivatorprotein, sowie ohne derartige Zusätze inkubiert. Die erzielten Abbauraten sind in Abb. 33 dargestellt.

Ohne aktivierende Zusätze zeigten die Normalextrakte in ihrer Fähigkeit, das Gangliosid abzubauen, eine sehr starke biologische Streuung. (Diese Streuung ist zum einen auf Unterschiede im Hexosaminidase A-Spiegel, zum anderen auf unterschiedliche Verdünnung des den Fibroblasten eigenen Aktivators im Homogenat zurückzuführen.) Extrakte von Zellen der verschiedenen Varianten der G_{M2} -Gangliosidose dagegen spalteten dieses Substrat alle nur sehr langsam.

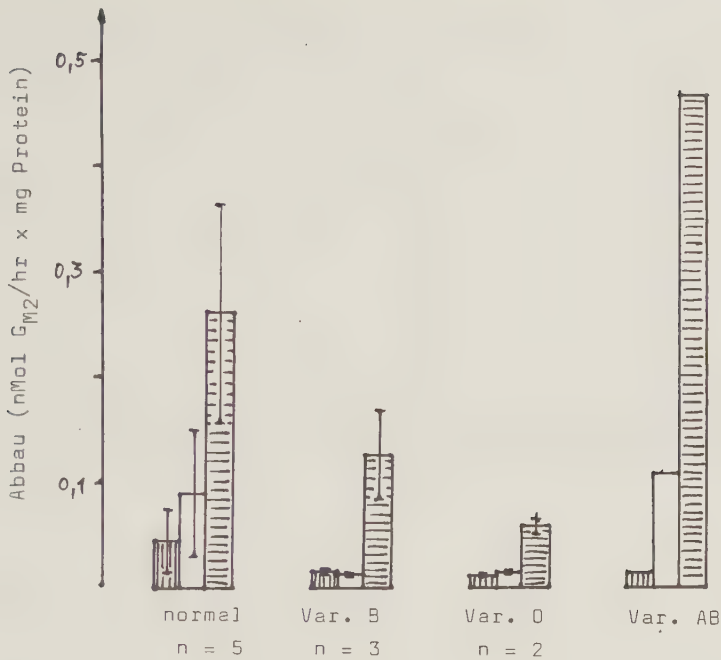


Abbildung 33: Abbau des Gangliosids GM_2 durch Extrakte normaler und pathologischer Fibroblasten

Fibroblasten verschiedener Herkunft wurden im 10-fachen Volumen destillierten Wasser homogenisiert (Potter-Elvehjem-Homogenisator) und nach Bestimmung des Proteingehalts zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Aliquote der Extrakte (20 μ l) wurden mit 10 nMol Gangliosid GM_2 , 4 μ Mol Citrat-Puffer, pH 4,2, und 0,35 AE Aktivator oder 0,1 μ Mol TDC, sowie ohne derartige aktivierenden Zusätze in einem Gesamtvolumen von 40 μ l für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die nach dem üblichen Verfahren (s. Material und Methoden) bestimmten Abbauraten wurden auf den im Homogenat gemessenen Gesamt-Proteingehalt bezogen. Die eingezeichneten Werte sind die Mittelwerte aus der jeweils angegebenen Anzahl verschiedener Fälle. Jeder Einzelwert wurde in Doppelbestimmung gemessen.



Abbau ohne Zusätze ($\pm$ Standardabweichung)



Abbau in Gegenwart des Aktivatorproteins



Abbau in Gegenwart von 2,5 mM TDC

In Gegenwart von zugesetztem Aktivatorprotein wurden bei den normalen Kontrollen etwa doppelt so hohe Abbauraten gemessen wie ohne Zusatz. Die - ohnehin sehr geringen - Umsätze durch Extrakte der Varianten O und B wurden durch den Aktivator erwartungsgemäß nicht erhöht. Eine Unterscheidung dieser beiden Varianten von Normalfällen ist aufgrund des Gangliosidumsatzes durch die Rohextrakte ohne aktivierende Zusätze fast nicht möglich, da einige Kontrollwerte bereits sehr niedrig liegen. Setzt man jedoch den Inkubationsansätzen das natürliche Aktivatorprotein zu, so tritt der Unterschied klar zu Tage: Der Abbau durch Normalextrakte wird stimuliert, der Umsatz durch Extrakte der Varianten B und O dagegen nicht.

Der Gangliosidabbau durch den Extrakt der Variante AB wurde durch die eingesetzte Aktivatorpräparation auf den 8,3-fachen Wert stimuliert. Dies zeigt, daß diese Zellen genügend intaktes Enzym besitzen, um in Gegenwart des Aktivators das Gangliosid G_{M2} zu spalten. Noch aussagekräftigere Daten erhält man, wenn man den Gangliosid-Umsatz nicht auf den Proteingehalt der Extrakte, sondern auf die in den Extrakten enthaltene, mit synthetischem Substrat bestimmte Menge Hexosaminidase A bezieht (Tabelle 7). Geht man davon aus, daß reine Hexosaminidase A unter den Inkubationsbedingungen ohne aktivierende Zusätze etwa 0,05 nMol Gangliosid G_{M2} pro Stunde und Enzym-Einheit spaltet (vgl. z.B. Abb. 31), so kann man die darüber hinausgehenden Werte der Anwesenheit des Aktivatorproteins zuschreiben und so dessen Konzentration abschätzen.

Die so erzielten Ergebnisse erlauben den Schluß, daß auch dieser Fall der Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose durch den Defekt des Aktivatorproteins für den Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} verursacht wird.

Wurde statt des Aktivatorproteins Detergens eingesetzt, so wurde bei den Normalfällen und bei der Variante AB eine noch höhere Stimulierung des Gangliosidumsatzes beobachtet. (Diese läßt sich allerdings auch durch Einsatz größerer Aktivatorkonzentrationen leicht erreichen.) Allerdings wurden unter diesen Bedingungen auch die Umsatzraten der Varianten O und B auf das 4 - 8-fache erhöht (Abb. 33).

Tabelle 7: Abbauraten des Gangliosids G_{M2} durch Extrakte aus Fibroblasten

Fall	Protein (mg/ml)	Abbau (nMol/hr·U)	daraus. berechneter Aktivatorgehalt (AE/mg Protein)
Variante AB	9,0	0,055	0,03
Norm. Kontr. 1	7,1	0,304	1,79
" 2	12,0	0,50	1,88
" 3	6,6	0,232	1,38
" 4	7,4	0,253	1,37
" 5	9,5	0,367	1,67

Die Herstellung der Extrakte und die Ansatzbedingungen sind in der Legende zu Abb. 34 beschrieben. Der Gehalt an Hexosaminidase A wurde nach der Hitzeinaktivierungsmethode bei 50°C (O'Brien et al., 1970) mit synthetischem Substrat gemessen (s. Material und Methoden).

Diese Erhöhung erklärt sich sehr wahrscheinlich aus der Fähigkeit der jeweils noch vorhandenen Isoenzyme Hexosaminidase S bzw. B, das Gangliosid G_{M2} in Gegenwart des Detergens abzubauen. (Für die Hexosaminidase B wurde dies bereits in Kapitel 2 demonstriert.)

Für die von vielen Arbeitskreisen angestrebte Diagnose der Varianten der G_{M2} -Gangliosidosen aus - leicht zugänglichen - Fibroblasten unter Verwendung der natürlichen Lipidsubstrate bedeutet dies, daß zuverlässige Resultate nur durch Einsatz des natürlichen Aktivatorproteins erhalten werden können. Die in Gegenwart von Detergentien gemessenen Umsatzraten geben - selbst unter Berücksichtigung der in Kapitel 2 geschilderten Befunde - ein falsches Bild.

5. Diskussion

Mutationen in der Erbinformation führen im menschlichen und tierischen Organismus zu entsprechend veränderten Genprodukten, die ihre Funktion oft nur noch mangelhaft oder gar nicht mehr erfüllen können. Die meisten Gene sind beim Menschen indessen doppelt vorhanden, in Form zweier Allele, deren eines väterlichen, das andere mütterlichen Ursprungs ist. Im Falle einer Mutation in einem Allel wird vom anderen nach wie vor ein funktionstüchtiges Protein codiert, so daß der Organismus noch über die Hälfte der normalen Menge dieses Proteins verfügt. Diese reicht in den meisten Fällen für den normalen Stoffwechsel aus. Wird dagegen von beiden Elternteilen ein Defekt desselben Genloci weitervererbt (rezesiver Erbgang), so fällt die Funktion des betroffenen Protein - etwa eine Enzymaktivität - ganz aus. Die möglichen Folgen solcher Defekte sind mannigfacher Art:

Betrifft die Störung ein Enzym, dessen Umsetzungsprodukt zum Leben nicht unbedingt nötig ist (etwa bestimmte, für die Blutgruppensubstanzen nötige Glykosyltransferasen) oder aus der Nahrung supplementiert werden kann (wie die bei Menschen, Affen und Meerschweinchen generell fehlende L-Gulonolacton-Oxidase, die zur Ascorbinsäure-Synthese benötigt wird), so können klinisch relevante Folgen ausbleiben.

Das andere Extrem, ein Defekt eines absolut lebenswichtigen Systems wie z.B. der oxidativen Phosphorylierung, konnte bislang noch nicht beobachtet werden und ist aus zwei möglichen Gründen auch nicht zu erwarten:

1. Die Information für ein derart wichtiges Protein dürfte im Erbmaterial wahrscheinlich nicht nur einfach (bzw. doppelt), sondern mehrfach angelegt sein. Der Ausfall einer "Kopie" wäre damit tragbar.
2. Würde ein solch lebenswichtiges System tatsächlich ausfallen, so würde der Fetus schon nach wenigen Zellteilungen absterben. Der Defekt als solcher wäre damit nicht beobachtbar.

Zwischen diesen beiden Extremen liegt das weite Spektrum derjenigen Defekte, die ein - mehr oder weniger eingeschränktes - Funktionieren des Gesamt-Organismus noch erlauben, aber zu klinisch relevanten Symptomen, den Erb-"Krankheiten" führen.

Die Gründe für das Auftreten können wiederum sehr unterschiedlich sein. Fehlt beispielsweise ein Enzym des anabolen Stoffwechsels, so kann der Mangel des Produkts der Enzymreaktion spürbar werden (z.B. Albinismus, Carnitin-Mangel). Ist dagegen ein katabolisches Enzym betroffen, so häuft sich in der Regel dessen Substrat an. Handelt es sich dabei um eine niedermolekulare, wasserlösliche Substanz, so kann diese oft im Urin ausgeschieden werden und die Störung kann symptomlos (essentielle Fructosurie, essentielle Pentosurie) oder nur mit milden Symptomen (Alkaptonurie) verlaufen, solange nicht die stark erhöhte Konzentration des Metaboliten Nebenwege des Stoffwechsels aktiviert, die zu schädlichen Produkten führen (z. B. der bei der Galaktosämie auftretende Dulcitol, der in der Cornea des Auges abgelagert wird und so zu Katarakten führt), oder Stoffwechselwege blockiert (wie das bei der Phenylketonurie sich im Blut anhäufende Phenylalanin, dessen hohe Konzentration den Transport der Aminosäure Tyrosin blockiert).

Betrifft die Abbaustörung jedoch ein Makromolekül (z.B. das Glykogen bei der Glykogenose Typ II ("Pompe'sche Erkrankung")) oder Membranbestandteile wie die Glykolipide, so ist ein derartiger Abtransport unmöglich. Nachdem diese Substanzen aufgrund der Kompartimentierung dieses Abbaus (nämlich im Lysosom) auch nicht anderweitig verstoffwechselt werden können, bleiben sie im Organ ihrer Entstehung liegen und häufen sich dort im Lauf der Zeit in immer größeren Mengen an. Diese Speichersubstanzen sind zwar eigentlich nicht toxisch, mit der Zeit nimmt aber die Akkumulation solche Ausmaße an, daß die Funktion des betroffenen Organs gestört wird, d.h., es kommt zu einer Speicherkrankheit.

Besonders tragische Folgen haben Störungen des Gangliosid-Abbaus, da Ganglioside fast ausschließlich in Nervenzellen vorkommen und im Falle einer Abbaustörung auch vorwiegend im Nervensystem gespeichert werden, wodurch dessen Funktion sehr stark beeinträchtigt wird. Dies hat dann eine neurale Symptomatik wie Krämpfe, Lähmungen, Blindheit usw. zur Folge und führt gewöhnlich innerhalb der ersten Lebensjahre zum Tode des Patienten.

Der Endabbau der Glykolipide erfolgt wie der der meisten Zellbestandteile in den Lysosomen (vgl. z.B. Vaes, 1973) und wird durch eine Reihe von Exoglykosidasen katalysiert, deren jede für einen einzelnen Zucker-Rest in bestimmter glykosidischer Bindung spezifisch ist (vgl. z.B. Gatt und Barenholz, 1973; Neufeld et al., 1975).

Diese Enzyme sind teils wasserlöslich, teils membrangebunden und entfalten ihre optimale Aktivität bei mäßig saurem pH-Wert (meist zwischen 4 und 5), wie er in den Lysosomen vorliegt (z.B. Ohkuma und Poole, 1978). Für manche komplexen Verbindungen sind im Lysosom mehrere voneinander unabhängige Abbauewege vorhanden. Für den Abbau von Glykoproteinen existieren beispielsweise neben den Exo- auch Endoglykosidasen sowie Proteasen; Glycerophospholipide wiederum können von einer Reihe verschiedener Phospholipasen unabhängig voneinander angegriffen werden. Für Glykosphingolipide dagegen gibt es keinen alternativen Abbaueweg. Jede der beteiligten Glykosidasen kann erst angreifen, nachdem der vorhergehende Hydrolyseschritt erfolgt ist. Deswegen führt der genetisch bedingte Ausfall eines dieser Enzyme dazu, daß der Abbau dieser Substanzen auf der betreffenden Stufe stehen bleibt. Es kommt dann zu den entsprechenden Lipid-Speicherkrankheiten.

Für die Sphingolipidosen gibt es bislang noch keine Therapie. Daher kommt der biochemischen Untersuchung der den Krankheitsformen jeweils zugrunde liegenden Enzymdefekte und, darauf aufbauend, der Ausarbeitung möglichst präziser und zuverlässiger diagnostischer Verfahren, sowohl für die Erkennung und genetische Beratung von Heterozygoten als auch für die pränatale Diagnose, große Bedeutung zu.

Diese Störungen sind jedoch nicht nur pathobiochemisch von Interesse. Ihre Untersuchung hat vielmehr auch sehr viel zur Aufklärung der normalen Stoffwechselwege beigetragen. Sie führte u.a. zur Entdeckung der Ganglioside (Klenk, 1942 a) und des Glucocerebrosids (Aghion, 1934), und anhand der Sphingolipidosen konnten die meisten Teilschritte des Sphingolipidabbaus aufgespürt und der Abbaueweg rekonstruiert werden.

Eine der am längsten bekannten und am gründlichsten untersuchten derartigen Speicherkrankheiten ist die G_{M2} -Gangliosidose, die ihren Namen von der hauptsächlich in den Nervenzellen der Patienten gefundenen Speichersubstanz,

dem Gangliosid G_{M2} , herleitet. Außer diesem Gangliosid wird bei den Patienten in geringerem Ausmaß noch das Glykolipid G_{A2} angehäuft und bei einer der enzymatischen Varianten (s.u.) findet man in den visceralen Organen eine Vermehrung des Nierenglobosids (Sandhoff et al., 1971). Alle diese Lipide tragen terminal einen β -glykosidisch gebundenen N-Acetyl-D-galaktosamin-Rest. Der erste Schritt beim enzymatischen Abbau dieser Substanzen, die Abspaltung dieses N-Acetyl-D-galaktosamins, wird durch das Enzym Hexosaminidase (2-Acetamido-2-desoxy- β -glucosid-Acetamido-desoxyglucohydrolase, E.C. 3.2.1.30 oder 3.2.1.52) katalysiert. In menschlichen Geweben findet man hauptsächlich 2 Isoenzyme, die Hexosaminidasen A und B (Robinson und Stirling, 1968; Sandhoff, 1968). Aufgrund der mit synthetischen, wasserlöslichen Substraten gemessenen Isoenzymdefekte kann man bei der G_{M2} -Gangliosidose drei verschiedene Varianten unterscheiden (Sandhoff et al., 1971): Bei der Variante O fehlen beide Hexosaminidasen A und B, vermutlich aufgrund eines Defektes der gemeinsamen Untereinheit (Geiger und Arnon, 1976), nur das Spurenenzym Hexosaminidase S ist noch aktiv. Dagegen führt der gleichzeitige Ausfall der Hexosaminidasen A und S, die ebenfalls eine gemeinsame Untereinheit besitzen, zur Variante B, der Tay-Sachs'schen Erkrankung. Bei der Variante AB schließlich sind sämtliche Hexosaminidase-Isoenzyme in normaler bis erhöhter Menge vorhanden, trotzdem kommt es auch hier zur Speicherung von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} .

Will man die bei den Patienten gefundene Lipidspeicherung mit den beobachteten Enzym-Defekten korrelieren, so ist es nötig, die Substrat-Spezifitäten der einzelnen Isoenzyme zu kennen. Die Messung des Abbaus der Lipidsubstrate durch die gereinigten Isoenzyme in vitro stößt jedoch auf eine prinzipielle Schwierigkeit der Lipid-Enzymatik: Die Lipide lösen sich in Wasser nicht monomolekular, sondern bilden größere Aggregate, im Fall der Glykolipide Mizellen (Gammack, 1963). In dieser Form sind sie für wasserlösliche Enzyme wie die Hexosaminidasen nur schwer zugänglich. Die Abbauraten sind deswegen verschwindend gering. Erfahrungsgemäß führt der Zusatz "geeigneter" Detergentien zu einer drastischen Erhöhung dieses Abbaus (z.B. Frohwein und Gatt, 1967; Sandhoff und Wässle, 1971; Tallman und Brady, 1972; O'Brien et al., 1977), deswegen wurden fast alle der-

artigen Untersuchungen in Gegenwart solcher Detergentien, meist Gallensalzen, durchgeführt. Nach welchem Mechanismus diese Aktivierung durch Detergentien geschieht und inwieweit die so gemessenen Substrat-Spezifitäten für die Verhältnisse in vivo Bedeutung besitzen, ist bislang jedoch kaum diskutiert worden.

Für den Mechanismus lassen sich zwei prinzipielle Möglichkeiten denken: Das Detergens kann entweder am Enzym angreifen, indem es beispielweise eine Konformation stabilisiert, die in die Mizellen einzudringen vermag, oder es kann das Substrat durch Bildung geeigneter Aggregate so aufbereiten, daß dieses dem Enzym zugänglich wird. Die in Kapitel 2 geschilderten Befunde sprechen ziemlich eindeutig für die zweite Möglichkeit:

Die Hexosaminidasen selbst werden durch das verwendete Detergens Taurodesoxycholat nicht aktiviert, sondern wie die Zeitabhängigkeit der Reaktion sowohl mit Lipidsubstraten als auch mit den wasserlöslichen synthetischen Substrat zeigt, langsam inaktiviert. Beim Abbau des wasserlöslichen Substrats wird daher mit Detergens eine Hemmung gemessen, deren Ausmaß von der Detergenskonzentration und von der Inkubationsdauer abhängt (Abb.5 a).

Im Falle der Lipid-Substrate ist dieser Inaktivierung ein zweiter, entgegengesetzter Effekt überlagert: Die in wässriger Lösung gebildeten Lipid-Aggregate werden vom Detergens in eine Form überführt, die dem Enzym wesentlich leichter zugänglich ist. Dies führt zu einer sehr starken Aktivierung des in Abwesenheit von Detergentien verschwindend geringen Lipid-Abbaus. In Gegenwart des Detergens steigt dieser jedoch nicht linear mit der Zeit an, sondern flacht wegen der Enzym-Inaktivierung nach kurzer Zeit ab und kommt nach wenigen Stunden Inkubationsdauer ganz zum Erliegen (Abb. 5 b).

Für die Detergensaktivierung des Lipid-Abbaus kann somit folgender Mechanismus angenommen werden: Die Lipide bilden, in reiner Form in Wasser dispergiert, große kompakte Mizellen, die vom Enzym nicht angegriffen werden können. Die zur Aktivierung verwendeten Gallensalze bilden oberhalb ihrer kritischen Mizell-Konzentration ebenfalls Aggregate, diese sind jedoch, bedingt durch die Struktur dieser Substanzen, sehr viel kleiner als die Lipid-Mizellen (typischerweise 2 - 10 Monomere pro

Mizelle (Helenius und Simons, 1975)). Mit den Glykolipiden bilden diese Gallensalze Mischmizellen, die ebenfalls sehr klein sind (vgl. z.B. Fischer, 1977) und aus denen die Oligosaccharid-Ketten der Glykolipide weit genug herausragen, um von den Enzymen angegriffen zu werden.

Das Auftreten eines Optimums der Detergenskonzentration ist aus der Überlagerung von Aktivierung des Substrats und Inaktivierung des Enzyms zu erklären: Bei der optimal aktivierenden Konzentration der eingesetzten Gallensalze, etwa dem 2 - 3-fachen der jeweiligen kritischen Mizell-Konzentration, liegt wahrscheinlich gerade genügend Detergens vor, um alles Substrat in solche Mischmizellen zu überführen. Eine weitere Steigerung der Detergenskonzentration führt nicht zu einer noch stärkeren Aktivierung des Abbaus, beschleunigt aber die Denaturierung des Enzyms. Damit kommt der Lipidabbau früher zum Erliegen und der nach einer bestimmten Inkubationsdauer gemessene Gesamt-Abbau fällt geringer aus als der mit der "optimalen" Detergenskonzentration gemessene.

Die Unfähigkeit der neutralen Detergentien, den Gangliosid-Abbau durch Hexosaminidasen zu stimulieren, beruht wahrscheinlich auf deren wesentlich größerer Mizell-Größe, für Triton X-100 wurde beispielweise eine Zahl von 140 Monomeren pro Mizelle berichtet (Kushner und Hubbard, 1954). Die mit diesen Detergentien gebildeten Mischmizellen dürften den reinen Glykolipid-Mizellen sehr ähnlich und damit für das Enzym ebenfalls unzugänglich sein.

Die Substrat-Spezifitäten der Hexosaminidase-Isoenzyme gegenüber Glykolipiden in Gegenwart von Detergentien wurden bereits früher gemessen (Sandhoff et al., 1977), sie sind in Tabelle 4 (Abschn. 2.3.) zusammengefaßt. Auf der Basis der so gemessenen Spezifitäten kann jedoch nur das Lipidspeichermuster der Variante O der G_{M2} -Gangliosidose zufriedenstellend erklärt werden. Das bei Patienten der Variante B gefundene Speichermuster läßt sich nur schwer mit diesen Daten in Einklang bringen, das Auftreten der Variante AB schließlich bleibt in diesem Zusammenhang vollends unverständlich (Abschn. 2.3.).

Die in Gegenwart von Detergentien gemessenen Substratspezifitäten müssen jedoch nicht notwendigerweise auch in vivo gelten. So wurde z.B. berichtet, daß das Lactosylceramid in

vitro unter Einsatz bestimmter Detergentien fast ausschließlich von der - löslichen - Gangliosid G_{M1} - β -Galaktosidase gespalten wird, in Gegenwart anderer Detergentien dagegen vornehmlich von der membrangebundenen Galaktocerebrosidase (Suzuki, 1979)

Am subzellulären Ort des Glykolipid-Abbaus, im Lysosom, sind indessen weder Gallensalze noch andere Detergentien vorhanden. Damit erhebt sich die Frage, wie die lysosomalen Hydrolasen in dieser Umgebung ihre Lipid-Substrate angreifen können. Der entscheidende Schritt zur Beantwortung dieser Frage war die Entdeckung der "Aktivatoren", relativ kleiner, enzymatisch inaktiver Proteine, die in vitro, an Stelle der Detergentien eingesetzt, den enzymatischen Lipid-Abbau sehr stark stimulieren. Das erste und bisher am besten untersuchte Beispiel ist das Aktivator-Protein für den Abbau von Cerebrosid-Sulfat durch die Arylsulfatase A (Mehl und Jatzkewitz, 1964; Fischer und Jatzkewitz, 1975). Für die Wirkungsweise des Aktivators schlugen die Autoren ein Modell vor: Danach bindet das - wasserlösliche - Aktivator-Protein Lipid-Monomere und bringt diese damit in Lösung. Der resultierende Aktivator-Lipid-Komplex ist das eigentliche Substrat der enzymatischen Reaktion (Fischer und Jatzkewitz, 1978). Weitere Sphingolipide, für deren Abbau derartige Aktivatoren nachgewiesen und teilweise charakterisiert wurden, sind Gangliosid G_{M1} (Li und Li, 1976) und Glucocerebrosid (Ho und O'Brien, 1971). Diese und einige andere Aktivatoren konnten Mraz et al., (1976) in einer Fraktion niedermolekularer löslicher Proteine aus sekundären Lysosomen der Rattenleber lokalisieren.

Auch für den Abbau von Gangliosid G_{M2} durch Hexosaminidasen wurde ein solches Aktivator-Protein beschrieben (Hechtman und Le Blanc, 1977), jedoch liegen die von den Autoren berichteten Stimulierungsfaktoren so niedrig, daß ernsthafte Zweifel an der physiologischen Bedeutung des von ihnen isolierten Proteins gerechtfertigt erscheinen.

Dagegen dürfte das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Aktivator-Protein tatsächlich den physiologischen Aktivator des Glykolipid-Abbaus durch Hexosaminidasen darstellen. Dafür sprechen hauptsächlich 2 Gründe:

- a) Der Aktivator stimuliert den Abbau sowohl des Gangliosids G_{M2} als auch des Glykolipids G_{A2} durch Hexosaminidase A weit über 100-fach (abhängig von der Aktivatorkonzentration), während eine Wechselwirkung mit der Hexosaminidase B kaum wahrzunehmen ist. Die in Gegenwart des Aktivators gemessenen Substrat-Spezifitäten der Isoenzyme (Abb. 24) vermögen die Lipidspeicher-Muster der verschiedenen Varianten der G_{M2} -Gangliosidose völlig zu erklären (Abschn. 3.3.4.).
- b) Der - in dieser Arbeit nachgewiesene - Ausfall des Aktivators bei der Variante AB (Kapitel 4) führt praktisch zur gleichen Krankheit wie der Ausfall der Hexosaminidase-Isoenzyme bei den anderen Varianten.

Der hier beschriebene Aktivator unterscheidet sich in 3 wesentlichen Punkten vom Präparat von Hechtman und Le Blanc:

- a) Er stimuliert im Gegensatz zum Hechtman'schen Aktivator auch den Abbau des Glykolipids G_{A2} durch Hexosaminidase A.
- b) Er besitzt ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht (25 000 gegenüber 36 000).
- c) Die von Hechtman und Le Blanc für den Abbau von Gangliosid G_{M2} in Gegenwart ihres Aktivators angegebenen Umsatzraten liegen etwa um den Faktor 100 niedriger als die mit dem hier beschriebenen Präparat erzielten.

Während angesichts der genannten Argumente als gesichert gelten kann, daß der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Aktivator auch in vivo für den Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} durch Hexosaminidase A nötig ist, bleibt die physiologische Bedeutung der Hechtman'schen Präparation unklar.

Kinetische Untersuchungen zeigten, daß der Mechanismus der Aktivierung des Gangliosidabbaus durch das in dieser Arbeit beschriebene Aktivatorprotein mit großer Wahrscheinlichkeit dem bereits geschilderten Modell von Fischer und Jatzkewitz folgt: Zwar wurde die Stöchiometrie der Aktivator-Gangliosid G_{M2} -Komplexbildung noch nicht untersucht, es ließ sich jedoch eindeutig nachweisen, daß solche Komplexe gebildet werden (Abschn. 3.2.7. und 3.3.7.). Auch entspricht die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substrat- und der Aktivatorkonzentration den aus diesem Modell abgeleiteten Erwartungen (Abschn. 3.3.6.). Der Abbau des wasserlöslichen Substrats

4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosaminid bleibt - ebenfalls erwartungsgemäß - vom Aktivator unbeeinflusst.

Neu ist dagegen in diesem Zusammenhang die Isoenzym-spezifität des Aktivators (Abschn. 3.3.4.). Die Tatsache, daß dieser nur bei der Reaktion mit Hexosaminidase A wirkt und nur in ganz geringem Maße mit der Hexosaminidase B (und wahrscheinlich auch nicht mit dem Spurenenzym Hexosaminidase S, vgl. Variante O in Abb. 33), läßt auf eine besondere Bindungsstelle für den Aktivator am Enzym schließen. Die Substratspezifitäten der Isoenzyme werden damit in vivo offensichtlich durch die Bindungseigenschaften des Aktivators bestimmt.

Der isoelektrische Punkt dieses Aktivators (pH 4,8) erklärt eine Beobachtung von Bach und Suzuki (1975): Diese fanden nach isoelektrischer Fokussierung eines Lebergesamtextraktes, daß nur die "saure Schulter" der Hexosaminidase A (isoelektrischer Punkt etwa pH 5) in der Lage sei, das Gangliosid G_{M2} zu spalten. Diese saure Schulter ist genau jene Region, in der sich die Peaks von Enzym und Aktivator überlappen.

Der Aktivator läßt sich in allen untersuchten Nierengeweiben, auch denen von Patienten der Varianten O und B der infantilen G_{M2} -Gangliosidose, leicht nachweisen und quantifizieren, nicht jedoch in Geweben von Patienten der Variante AB. Nachdem die Gegenwart von Inhibitoren ebenso wie Lagerungsschäden praktisch ausgeschlossen werden konnten, muß also der Defekt dieses Aktivators als Ursache dieser Krankheit angenommen werden.

Der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose kommt damit für das Verständnis der Rolle der Aktivatoren beim Glykolipid-Abbau besondere Bedeutung zu: Das Auftreten dieser Krankheit als Folge des Aktivatordefekts beweist, daß der Aktivator in vivo für den Abbau von Gangliosid G_{M2} und Glykolipid G_{A2} notwendig ist. Für die Spezifität der Aktivatoren ergibt sich die wichtige Folgerung, daß die Funktion des defekten Aktivatorproteins von keinem der anderen Aktivatoren übernommen werden kann. Dies steht in Einklang mit den Befunden in vitro, daß die Aktivatorproteine für den Abbau von Sulfatiden und von Gangliosid G_{M1} kaum einen Einfluß auf

den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch Hexosaminidasen haben (Sandhoff et al., 1977). Umgekehrt läßt sich aus dem Lipid-Speichermuster bei dieser Variante ablesen, für welche Lipide der defekte Aktivator zuständig ist. Im Falle der Variante AB sind dies nur das Gangliosid G_{M2} und dessen Asialo-Rest G_{A2} . Der Abbau des dritten Lipid-Substrats der Hexosaminidasen, des Nierenglobosids, wird offensichtlich auf andere Weise aktiviert. Die in vitro gemessenen Umsatzraten dieser Glykolipide durch Hexosaminidasen entsprechen diesen Befunden: Während in Gegenwart von Detergentien das Nierenglobosid von allen drei Lipidsubstraten am schnellsten gespalten wird (Tabelle 4) (wahrscheinlich, weil dessen Tetrasaccharidketten weiter aus der Mizelle herausragen als die Trisaccharidketten der beiden anderen Substrate), ist sein Umsatz in Gegenwart des Aktivators der langsamste von allen (Abb. 24).

Mit dem Nachweis des Defektes eines für den Glykolipid-Abbau benötigten Aktivatorproteins als Ursache einer Lipidose wurde ein neues Prinzip für Speicherkrankheiten aufgefunden: Die Enzyme sind nach wie vor intakt, können aber ihre membranständigen Lipid-Substrate nicht erreichen.

Daß es sich bei der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose nicht um einen Einzelfall handelt, sondern vielmehr um einen ersten Vertreter einer ganzen Gruppe solcher Krankheiten, zeichnet sich bereits ab: Anknüpfend an die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde berichteten Kaback und Mitarbeiter (Stevens et al., 1979) inzwischen über eine Variante der Metachromatischen Leukodystrophie, die sehr wahrscheinlich nicht durch den sonst bei dieser Krankheit gefundenen Ausfall der Arylsulfatase A (Mehl und Jatzkewitz, 1964), sondern durch einen Defekt des Aktivatorproteins für den Abbau von Sulfatiden durch dieses Enzym verursacht wird.

Auf die Konsequenzen, die die Rolle der Aktivatoren beim Sphingolipidabbau für die Diagnostik der Sphingolipidosen mit sich bringt, wird an etwas späterer Stelle noch näher eingegangen (s.u.).

Für den Abbau der Sphingolipide existieren grundsätzlich 2 Möglichkeiten, nämlich

1. Umbau der Lipide durch Enzyme der Plasmamembran. Über dieses Gebiet ist bis jetzt noch relativ wenig bekannt. Sicher nachgewiesen wurden bisher unter anderem eine neutrale, Mg-abhängige Sphingomyelinase (Gatt et al., 1978) und eine saure, auf Ganglioside mit terminaler Neuraminsäure wirkende Neuraminidase (Öhman et al., 1970). Welche Funktion diesen Enzymen in vivo zukommt und wie sie reguliert werden, ist bislang noch nicht bekannt. Eine wichtige Rolle scheint unter anderem die Membranfluidität zu spielen (Sandhoff und Pallmann, 1978; Sandhoff et al., in Vorbereitung).
2. Der Abbau der Lipide in Lysosomen. Dieser scheint für Sphingolipide ebenso wie für die meisten anderen Zellbestandteile der eigentliche Endabbau zu sein.

Wie die Bestandteile der Plasmamembran in das Lysosom gelangen, ist bis jetzt noch unbekannt. Es wäre beispielsweise denkbar, daß spezielle Transportsysteme, ähnlich den Phospholipid-Austauschproteinen (Kamp et al., 1973) oder auch den Aktivatoren, existieren, die selektiv einen bestimmten Stofftransport garantieren, eventuell sogar regulieren. Wesentlich wahrscheinlicher scheint jedoch, daß Fragmente der Plasmamembran als Ganzes nach innen abknospen und im Zytosol entweder direkt mit primären Lysosomen fusionieren oder, wie intrazelluläres Material, von Phagosomen aufgenommen werden, die ihrerseits mit dem primären Lysosom fusionieren (vgl. Novikoff, 1973).

Im Lysosom können dann einige Abbauschritte durch membrangebundene Enzyme direkt durchgeführt werden (die in den Plasmamembranen vorhandene saure Neuraminidase spielt möglicherweise eine wichtige Rolle beim Gangliosid-Abbau), die Wechselwirkung mit löslichen Enzymen muß dagegen durch Aktivatorproteine vermittelt werden.

Es ist dabei durchaus denkbar, daß diese Aktivatoren in der Lage sind, die betreffenden Lipid-Moleküle aus den inkorporierten und abzubauenden Membranfragmenten "heraus-zuziehen". Der starke Unterschied in den Dissoziationskonstanten der Komplexe des in dieser Arbeit beschriebenen

Aktivators mit Gangliosid G_{M2} und mit dessen Asialorest G_{A2} (Tabelle 6) zeigt nämlich, daß diese Komplexe nicht nur auf einer hydrophoben Wechselwirkung beruhen, sondern daß auch der hydrophile Rest vom Aktivator erkannt und gebunden wird. Der Übergang des Glykolipids von der unpolaren Umgebung innerhalb der Membran zur postulierten hydrophoben Rinne oder Tasche am Aktivatorprotein könnte also ziemlich "nahtlos", d.h., nicht auf dem Umweg über die Wasserphase erfolgen, würde also nur eine geringe Aktivierungsenergie benötigen.

Der Aktivator-Lipid-Komplex wird dann vom Enzym als Substrat erkannt, gebunden und umgesetzt. Die Spezifität dieser Bindung dürfte entscheidend sein für die bereits erwähnte Spezifität der Aktivatoren und damit gleichzeitig für die Substratspezifität der Isoenzyme.

Nach Beendigung der Reaktion könnte das Lipid auf einen anderen Aktivator übertragen oder in einer entsprechend umgekehrten Reaktion in eine Membran zurücktransferiert werden. Die abgespaltenen Zucker können durch die Lysosomenmembran in das Cytosol der Zelle diffundieren, wo sie dem weiteren Stoffwechsel unterliegen (Goldman, 1976; Reijngoud und Tager, 1977). Ob diese Diffusion durch spezielle Transportsysteme erleichtert wird, oder ob die lysosomale Membran für Monosaccharide genügend permeabel ist, kann bislang noch nicht entschieden werden. Die inverse Abhängigkeit der Diffusionsrate durch die Lysosomenmembran vom Molekulargewicht des Zuckers spricht indes für die letztere Möglichkeit (Lloyd, 1969). Diese widerspricht nur scheinbar der Undurchlässigkeit dieser Membran für Protonen, die zur Aufrechterhaltung des lysosomalen pH-Wertes von 4 - 5 nötig ist. Tatsächlich können ungeladene Moleküle, auch Zucker, Membranen und Lipid-Doppelschichten wesentlich leichter passieren als Ionen (vgl. Stryer, 1975, pp 239f.), die eine relativ große Hydrathülle besitzen.

Das Schicksal der letztlich übrigbleibenden Fettsäure und des Sphingosins ist dagegen noch ungeklärt. Die Beantwortung der Frage, ob diese im Lysosom noch weiter abgebaut werden, oder ob sie ebenfalls das Lysosom verlassen und, wenn ja, wie dieses geschieht, muß der weiteren Forschung vorbehalten bleiben.

Die Notwendigkeit der Aktivatorproteine für die Wechselwirkung zwischen Enzym und Lipid-Substrat legt die Frage nahe, ob diesen Aktivatoren auch eine regulatorische Funktion für den Lipid-Abbau zukommt. Eine solche Funktion ist zwar nach den bisher vorliegenden Daten nicht auszuschließen, dagegen spricht jedoch eine grundsätzliche Überlegung zur Funktion der Lysosomen:

Die Lysosomen dienen der hydrolytischen Zerlegung der in sie eingeschleusten komplexen Moleküle in deren Bausteine. Es ist kein Fall bekannt, in dem einmal im Lysosom befindliches Material dieses vor Beendigung des Abbaus wieder verläßt. Eine Regulation müßte also bereits auf der Stufe der Einschleusung ins Lysosom erfolgen. Es wäre zwar, wie bereits erwähnt, denkbar, daß die Aktivatoren auch an diesem Prozeß beteiligt sind (ihr Vorkommen auch außerhalb des Lysosoms konnte bisher noch nicht ausgeschlossen werden), dann wäre jedoch zu erwarten, daß im Falle des Aktivatordefekts bei der Variante AB die Speichersubstanzen nicht in die Lysosomen gelangen und sich daher auch nicht die bei den Varianten B und O beobachteten Speichergranula (= pathologisch veränderte Lysosomen, Samuels et al., 1963; Terry und Weiss, 1963) bilden. Diese werden jedoch auch bei der Variante AB gefunden (de.Baecque et al., 1975).

Die Rolle der Aktivatoren beim enzymatischen Sphingolipid-Abbau bringt auch einige Konsequenzen für die Diagnose der Sphingolipidosen mit sich.

Diese Diagnose geschieht meist durch Messung der Aktivität der entsprechenden Enzyme in Homogenaten oder Extrakten aus Leukozyten oder in Kultur weitergezüchteten Zellen der Patienten, meist Hautfibroblasten, manchmal - zur pränatalen Diagnose - Amnionzellen. Im Falle klarer Enzymdefekte ist in der Regel die Messung mit synthetischen wasserlöslichen Substraten ausreichend; oft wird jedoch von einem Enzym eine mehr oder minder große Restaktivität gefunden, obwohl das klinische Bild auf den Ausfall dieses Enzyms zu deuten scheint oder gar die Analyse einer Biopsie eine Speicherung des entsprechenden Lipid-Substrates enthüllt. In solchen Fällen muß die Fähigkeit des noch vorhandenen Enzyms zum Abbau seiner Lipid-Substrate geprüft werden. Dies geschah bisher unter Verwendung von Detergentien (O'Brien et al., 1977; Svennerholm, 1976).

Derartige Messungen können jedoch ein falsches Bild ergeben (Abschn. 2.3.), da die in Gegenwart von Detergentien bestimmten Substratspezifitäten der Isoenzyme (vgl. Tabelle 4) sich von den mit Aktivator gemessenen (Abb. 24) unterscheiden können. Außerdem bringen Detergentien noch den zusätzlichen Nachteil mit sich, daß sie, insbesondere bei langer Inkubationsdauer, das Enzym denaturieren. Zuverlässige und aussagekräftige Resultate sind daher nur zu erwarten, wenn zur Stimulierung des zu messenden Lipid-Abbaus das entsprechende natürliche Aktivatorprotein eingesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit beschriebene erste Untersuchungen (Abschn. 2.3.) zeigten bereits, daß dieser Ansatz prinzipiell möglich und sinnvoll ist. Durch Vergleich der in Gegenwart und in Abwesenheit des Aktivators erzielten Abbauraten des Gangliosids G_{M2} durch Fibroblastenextrakte und des mit synthetischen Substraten bestimmten Hexosaminidase-Gehalts derselben Extrakte konnte sogar bei einem zweiten Fall der - extrem seltenen - Variante AB der G_{M2} -Gangliosidose der Aktivatorprotein-Defekt und damit die Diagnose bestätigt werden.

6. Material und Methoden

6.1. Materialien

6.1.1. Chemikalien

Verwendet wurden folgende Chemikalien:

Galaktose-Oxidase, NaBH_4 , Taurocholat, Taurodesoxycholat, Taurochenodesoxycholat, Glykodesoxycholat, Glykochenodesoxycholat, Triton CF-54, Rinderserumalbumin und Methyl- α -D-glucopyranosid der Fa. Sigma, St. Louis, USA,

Acrylamid, Methylen-N,N'-bisacrylamid, Tetramethyl-äthylendiamin, Coomassie Brilliant Blue R 250, Triton X-114, Pronase P der Fa. Serva, Heidelberg, Sephadex G-75, Sephadex G-100, Sepharose 4 B, Octyl-Sepharose 4 B, Concanavalin A-Sepharose 4 B und Dextranblau 2000 der Firma Pharmacia, Schweden,

DEAE-Zellulose (DE 52) und CM-Zellulose (CM 52) der Fa. Whatman, England,

Triton X-100, Triton N-101, N-Acetyl-D-galaktosamin und 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid der Fa. Koch-Light, England,

Tween 20 der Fa. Roth, Karlsruhe,
Ampholine der Fa. LKB, Bromma, Schweden,
Bio-Gel P 200 der Fa. Bio-Rad, München,
4-Methylumbelliferon der Fa. Fluka, Schweiz,
Cytochrom C, Chymotrypsinogen, Ovalbumin von der Fa. Boehringer, Mannheim,

$[^3\text{H}]$ -Leucin und $[^3\text{H}]$ - NaBH_4 von der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig, sowie

Szintillator-Lösung ("Unisolve 100") von der Fa. Zinsser, Frankfurt/Main.

Natriumcholat, Rhodamin 6 G, Riboflavin, Bromphenolblau, Folin-Ciocalteus Reagens, Kieselgel G, Kieselgel 60-beschichtete DC-Folien, sowie alle Puffersubstanzen und Lösungsmittel stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Alle Chemikalien waren entweder p.a. oder vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

Der zur Affinitätschromatographischen Reinigung der Hexosaminidasen verwendete Affinitätsligand (6-Aminohexyl)-1-thio-2-acetamido-2-desoxy- β -D-galaktopyranosid (ATG) war bereits früher synthetisiert worden (Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977), ebenso das nach Findlay et al. (1958) hergestellte 2-Acetamido-2-desoxy-D-gluconolakton.

Glykolipid G_{A2} und Nierenglobosid, die nach bereits beschriebenen Methoden (Sandhoff et al., 1971) aus Nieren bzw. Gehirn von an M. Tay-Sachs verstorbenen Patienten isoliert und durch katalytische Reduktion der Shingosin-Doppelbindung mit Tritium-Gas radioaktiv markiert worden waren, standen im Arbeitskreis zur Verfügung.

Ebenfalls zur Verfügung stand Gangliosid G_{M2} , das aus dem Gehirn eines Tay-Sachs-Patienten nach der Vorschrift von Svennerholm isoliert worden war (Svennerholm, 1972). Die radioaktive Markierung dieses Gangliosids ist nachfolgend beschrieben (Abschn. 6.2.1.).

6.1.2. Gewebe und Zellen

Postmortales Hirn-, Leber- und Nierengewebe eines an der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose verstorbenen Patienten wurden freundlicherweise von Dr. Ellis, London, zur Verfügung gestellt.

Dr. K. Suzuki, New York, übersandte uns freundlicherweise bereits angezüchtete Hautfibroblasten eines zweiten Falles der Variante AB. Diese Zellen wurden in unserem Labor weitergezüchtet (s.u.).

Gewebe von Patienten der anderen Varianten der infantilen G_{M2} -Gangliosidose waren schon früher von anderen Arbeitskreisen zur Verfügung gestellt worden. Sie waren in der Regel bis zur Verwendung bei -70°C gelagert worden.

Hautfibroblasten anderer Patienten sowie normaler Kontrollen waren in flüssigem Stickstoff gelagert worden. Sie wurden bei Bedarf angezüchtet.

Zu Vergleichszwecken sowie zur Isolierung von Enzym und Aktivator verwendete Normalgewebe waren o.B. und normalerweise weniger als 24 Std. post mortem entnommen und bei -70°C tiefgefroren worden.

6.1.3. Andere Aktivatorproteine

Je etwa 1 mg der gereinigten Aktivatorproteine für den Abbau von Sulfatiden durch Arylsulfatase A sowie für den Abbau des Gangliosids G_{M1} durch die entspr. β -Galaktosidase wurden von Dr. Fischer, München, bzw. von Dr. Li, New Orleans, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

6.2. Methoden

6.2.1. Radioaktive Markierung des Gangliosids G_{M2}

A) Vorreduktion

Etwa 0,5 g dünnenschichtchromatographisch reines Gangliosid G_{M2} wurden in 10 ml dest. Wasser und 40 ml über Aluminiumoxid vorgereinigtem Tetrahydrofuran gelöst und mit 100 mg $NaBH_4$ in 3,2 ml 0,1 M NaOH vorreduziert. Überschüssiges Borhydrid wurde durch Zugabe von 7 ml 10 M Essigsäure im Eisbad unter Rühren hydrolysiert, anschließend wurde die Mischung mit 13 ml 5 M NaOH neutralisiert. Das Tetrahydrofuran wurde im Stickstoff-Strom abgedampft, die restliche Lösung auf ein Volumen von 40 ml einrotiert, über Nacht gegen 4 l dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

B) Oxidation mit Galaktose-Oxidase

Das vorreduzierte Gangliosid G_{M2} wurde in einer Mischung aus 40 ml vorgereinigtem Tetrahydrofuran und 40 ml 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, gelöst. Zu dieser Lösung wurden 900 U (2,2 mg) Galaktose-Oxidase in 6 ml Phosphatpuffer, sowie 10 mg Katalase in 0,5 ml Wasser zugegeben. Nach 9-stündigem Schütteln bei 25°C wurden weitere 900 U, nach 19 Std. noch einmal 450 U Galaktose-Oxidase zugefügt. Nach insgesamt 24 Std. wurde das Tetrahydrofuran im Stickstoff-Strom abgedampft, der Rückstand (50 ml) wurde mit 200 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) ausgeschüttelt, die Unterphase mit 160 ml theoretischer Oberphase nachextrahiert (Chloroform/Methanol/Wasser, 3:48:47, v/v/v). Die vereinten Oberphasen (200 ml) wurden 3 Tage gegen dest. Wasser dialysiert, dann lyophilisiert.

C) Reduktion mit $[^3H]-NaBH_4$

Der lyophilisierte Gangliosid G_{M2} -Aldehyd wurde in

40 ml über Aluminiumoxid gereinigtem Tetrahydrofuran und 10 ml dest. Wasser gelöst und bei Raumtemperatur mit 0,93 mg $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$ (250 mCi) in 2,5 ml 0,1 M NaOH versetzt. Nach 1 Std. wurde 1 mg NaBH_4 zugegeben und über Nacht weitergerührt. Zur Sicherstellung einer vollständigen Reduktion wurden anschließend noch 100 mg festes NaBH_4 zugefügt und weitere 2 Std. gerührt. Dann wurden unter dem Abzug 7 ml 10 M Essigsäure zugesetzt. Das Tetrahydrofuran wurde im Stickstoff-Strom abgedampft, die verbleibende Lösung wurde gegen 3 Wechsel à 4 l dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 25 ml Chloroform/Methanol (9:1, v/v) aufgenommen und auf eine Kieselgel G-Säule (75 ml), die im selben Lösungsmittelgemisch gepackt worden war, beladen. Die Säule wurde mit folgenden Laufmitteln eluiert:

- a) 0,7 l Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v/v)
- b) 1,4 l " " " (60:32:7, ")
- c) 0,3 l " " " (60:35:8, ")

(nach Svennerholm, 1972).

Fraktionen à 20 ml wurden gesammelt, auf Radioaktivität geprüft, und die aktiven Fraktionen dünnenschichtchromatographisch (auf Kieselgel 60-Platten, E. Merck, Darmstadt; Laufmittel: Chloroform/Methanol/2,5 N NH_3 , 65:35:8, v/v/v) auf Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die das Gangliosid $\text{G}_{\text{M}2}$ mit weniger als 0,2 % Verunreinigungen enthielten, wurden vereint, einrotiert, gewogen und in einer Konzentration von 1 mM in organischer Lösung (52% Benzol, 33 % Äthanol, 10 % Chloroform und 5 % Methanol) aufgenommen. Die Ausbeute betrug 240 mg (48 %), die spezifische Markierung 18 400 cpm/nMol, was bei einer Zählausbeute von etwa 45 % für ^3H im Flüssigkeitsszintillationszähler einer Aktivität von 18,6 Ci/Mol entspricht.

6.2.2. Messung der Hexosaminidase-Aktivität

6.2.2.1. Synthetisches Substrat

Als solches diente 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (MUGlcNAc; Leaback und Walker, 1961). Das Substrat wurde in einer Konzentration von 2 mM in 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,4, gelöst. Von einer entsprechend verdünnten Enzymlösung wurden 0,1 ml mit 0,1 ml Substrat-Pufferlösung gemischt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die

Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stopp-Lösung (0,2 M Natriumkarbonat und 0,2 M Glycin) beendet. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon (MUF) wurde im Fluorimeter (Locarte Co., London) mit Durchflußküvette anhand seiner Fluoreszenz bei 440 nm bei Anregung mit 365 nm (Hg-Dampf-Lampe) bestimmt. Als Standard dient eine MUF-Lösung bekannter Konzentration (0,5 - 25 μ M) im Stopp-Puffer.

Nach internationaler Definition ist eine Enzym-Einheit (engl. "unit", abgek. U) definiert als die Menge an Enzym, die unter Standard-Bedingungen 1 μ Mol Substrat/Min. umsetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten der Hexosaminidase-Aktivität beziehen sich auf obiges Substrat und obige Ansatz-Bedingungen.

6.2.2.2. Gangliosid G_{M2}

Der Abbau des Gangliosids G_{M2} wurde im Wesentlichen nach der Methode von O'Brien et al. (1977) gemessen: Im Galaktosamin-Anteil tritiummarkiertes Gangliosid G_{M2} (s. 6.2.1.) (18 400 cpm/nMol) wurde in einer Konzentration von 1 mM in 0,4 M Citrat-Puffer, pH 4,0, durch Ultraschall (3 x 5 Sek., 100 W; Branson Sonifier B 12, Branson Co., Danbury, Conn., USA) micellar dispergiert. Der Standard-Ansatz enthielt 10 μ l dieser Lösung, dazu Enzym und andere Bestandteile in einem Gesamtvolumen von 40 μ l. Nach 1 - 3 Std. Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml eines Gemisches von Chloroform, Methanol und 2,5 N NH₃ (80:20:1, v/v/v) gestoppt, mit 0,5 ml 1mM wässriger Galaktosamin-Lsg. versetzt, gut geschüttelt und zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Die Oberphase wurde vorsichtig abgehoben und auf eine vorbereitete kleine Säule (1 ml DEAE-Zellulose in Pasteur-Pipette, mit dest. Wasser gewaschen) gegeben. Die Säule wurde mit 2 x 1 ml N-Acetylgalaktosamin-Lösung nachgewaschen, die vereinten Eluate in einem Szintillationsgefäß (Fa. Zinsser, Frankfurt/Main) aufgefangen, mit 17,5 ml Unisolve 100 (Fa. Zinsser, Ffm) versetzt und im Flüssigkeits-szintillationszähler gemessen.

Der Untergrund der Methode beträgt etwa 100 cpm, so daß ein Abbau von 0,5 pMol (0,05 % des eingesetzten Substrats; etwa 90 cpm) noch signifikant gemessen werden kann.

6.2.2.3. Glykolipid G_{A2} und Nierenglobosid

Beide Substrate, Glykolipid G_{A2} (= Trihexosylceramid, THC) und Nierenglobosid, waren nach bereits beschriebenen Methoden (Sandhoff et al., 1971) durch katalytische Hydrierung der Doppelbindung im Sphingosin-Anteil mit Tritium-Gas radioaktiv markiert worden. Die Ansätze für den enzymatischen Abbau enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,1 ml 12,5 nMol Substrat, 10 µMol Citratpuffer, pH 4,2, Enzym (20 - 500 mU) und weitere Zusätze sowie dest. Wasser. Vor Zugabe der Enzymlösung wurden die Ansätze mit Ultraschall behandelt (3 x 5 Sek., 100 W). Nach der Inkubation (0,5 - 4 Std.) bei 37°C wurden 20 µl eines jeden Ansatzes auf DC-Plastikfolien (Kieselgel 60, Nr 5748, E. Merck, Darmstadt) aufgetragen und im Laufmittel-System Chloroform/Methanol/Wasser (70:30:5, v/v/v) aufgetrennt. Nach dem Trocknen der Platten wurden die Flecke von Substrat und Abbauprodukt mit einem Dünnschichtscanner lokalisiert (Berthold LB 2722, Berthold, Wildbad), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert. Der prozentuale Abbau kann nach der Formel

$$\text{Abbau (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{Produkt}}}{\text{cpm}_{\text{Substrat}} + \text{cpm}_{\text{Produkt}}} \times 100$$

berechnet werden, da Substrat und Produkt die gleiche molare Aktivität aufweisen.

6.2.2.4. Bestimmung des Aktivatorgehalts

Standard-Ansätze mit Gangliosid G_{M2} (Abschn. 6.2.2.2.) mit 0,1 U Hex A, 0,5 mg Rinderserumalbumin/ml sowie 10 µl der auf Aktivatorgehalt zu prüfenden Lösung wurden 1 - 3 Std. bei 37°C inkubiert, dann wie beschrieben aufgearbeitet.

Als eine Aktivator-Einheit (AE) wurde die Aktivator-Menge definiert, die (im Bereich linearer Abhängigkeit) eine Steigerung des Gangliosidabbaus um 1 nMol/hr x U Hex A bewirkte.

6.2.3. Enzym-Isolierung

Die Anreicherung und Reinigung der Hexosaminidasen erfolgte nach bereits beschriebenen Verfahren (Conzelmann, 1976; Sandhoff et al., 1977):

Tiefgefroren (-70°C) gelagerte postmortale menschliche Leber (100 g) wurde aufgetaut, in 400 ml dest. Wasser homo-

genisiert (Ultraturrax, Janke + Kunkel, Staufen i. Br.) und 30 min. bei 13 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde 2 mal mit jeweils 250 ml dest. Wasser nachextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden gegen 20 l 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, dialysiert und auf eine Concanavalin A-Sepharose 4 B-Säule beladen. Nach gründlichem Nachwaschen mit Phosphatpuffer mit 0,1 M NaCl bei 20°C wurden die gebundenen Glykoproteine mit 10 % (w/v) Methyl- α -D-glucopyranosid im gleichen Puffer, ebenfalls bei 20°C, eluiert. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,0 dialysiert. Alle weiteren Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C.

Als nächste Reinigungsstufe wurde eine Affinitätschromatographie eingesetzt. Das Affinitätsgel bestand aus Sepharose 4 B, an die nach der Bromcyan-Methode (Cuatrecasas und Anfinsen, 1970) der eigens synthetisierte Ligand (6-Amino-hexyl)-2-acetamido-2-desoxy-1-thio- β -D-galaktopyranosid (ATG) gekoppelt worden war (Sandhoff et al., 1977). Eine derartige Affinitätssäule wurde mit der rohen Hexosaminidase-Präparation beladen (etwa 10 Enzym-Einheiten/ml Gel), mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, dann mit 10 mM Citratpuffer, pH 4,4, gewaschen und mit 0,1 mM 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucanolacton im selben Citratpuffer eluiert. Proben der einzelnen Fraktionen wurden mit 100 mM Phosphatpuffer, pH 8,3, verdünnt (zur Hydrolyse des Lactons) und ihre Enzymaktivität gemessen.

Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereint, gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, dialysiert und auf eine kleine (2 ml) DEAE-Zellulose-Säule gegeben. Die auf der Säule gebundene Hexosaminidase A wurde nach kurzem Nachwaschen (10 ml verdünnter Phosphatpuffer) mit einem Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in Phosphatpuffer eluiert und nach Messung von Proteingehalt und Enzymaktivität bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Hexosaminidase B wird unter diesen Bedingungen von DEAE-Zellulose nicht gebunden und erscheint in den Beladungs- und Nachwaschfraktionen. Diese wurden auf eine 1 ml-Säule mit CM-Zellulose im selben Phosphatpuffer gegeben und nach kurzem Nachwaschen wurde das B-Enzym mit einem NaCl-Gradienten (0 - 1 M im gleichen Puffer) eluiert und, nach Bestimmung von

Protein und Enzym-Aktivität, zunächst gegen Wasser dialysiert und dann bis zur weiteren Verwendung eingefroren (-20°C).

Im Falle sehr geringer Proteinkonzentrationen wurde den Enzymen 0,1 mg Cytochrom C/ml zugesetzt.

Die Ausbeuten lagen bei 40 - 50 %, die Enzyme gaben in der Elektrophorese je eine Bande, die mit der Bande der Enzymaktivität übereinstimmte. Die spezifischen Aktivitäten lagen bei 90 - 100 U/mg für Hexosaminidase A und bei 180 U/mg für Hexosaminidase B.

6.2.4. Aktivator-Anreicherung

6.2.4.1. Homogenate und Extrakte

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, alle Puffer enthielten zur Unterdrückung des Wachstums von Mikroorganismen 0,01 % NaN_3 .

Tiefgefrorene postmortale menschliche Nieren wurden mit dem 4-fachen Gewicht an dest. Wasser homogenisiert (Ultraturrax, Janke + Kunkel, Staufen i. Br.) und 30 Min. bei 13000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit der gleichen Menge Wasser nachextrahiert und noch einmal zentrifugiert. Die vereinten Überstände wurden der Hitzeinaktivierung unterworfen.

6.2.4.2. Hitzebehandlung und Säurefällung

Die Extrakte wurden in einem Wasserbad für 1 Std. (bei Volumina über 1 l für 1,5 Std.) auf einer Temperatur von 60°C gehalten, dann abzentrifugiert (30 Min. bei 13 000 g). Das Sediment wurde verworfen, der Überstand wurde in der Kälte durch langsame Zugabe einer geringen Menge von 0,1 M Citronensäure auf pH 4,0 titriert, dann 1 Stunde in der Kälte gerührt und zentrifugiert (30 Min. bei 13 000 g). Das Sediment wurde wiederum verworfen, der Überstand wurde gegen 40 l 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, dialysiert. Bei dieser Dialyse ausgefallenes Protein wurde ebenfalls abzentrifugiert und verworfen.

6.2.4.3. Ionenaustauschchromatographie

DEAE-Zellulose (300 ml, Whatman DE 52) wurde nach der Vorschrift des Herstellers gewaschen, in eine Säule gepackt und mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, äquilibriert. Die Säule

wurde mit dem dialysierten Überstand der Säurefällung beladen, kurz nachgewaschen (2 Säulenvolumina), dann mit einem NaCl-Gradienten (0 - 0,5 M) in 1 l desselben Puffers eluiert. Fraktionen à 20 ml wurden gesammelt und auf Protein- und Aktivatorgehalt geprüft.

6.2.4.4. Gelfiltration an Bio-Gel P 200

Die Aktivatorprotein enthaltenden Fraktionen der DEAE-Säule wurden vereint, ohne vorhergehende Dialyse gefriergetrocknet und in 20 ml 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 aufgenommen (bis maximal 20 mg Protein/ml). Der gelegentlich zu beobachtende unlösliche Rückstand wurde durch kurzes Zentrifugieren entfernt. Die klare Lösung wurde auf eine 500 ml-Säule mit Bio-Gel P 200 (Bio-Rad, München) gegeben und in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 mit 25 mM NaCl mit einer Durchflußrate von 12 ml/hr (2,5 cm/hr) chromatographiert. Die Fraktionsgröße betrug etwa 20 ml. Mit einem angeschlossenen Durchfluß-Photometer (Uvicord IF, LKB, Schweden) konnte der Proteingehalt des Eluats verfolgt werden. Nach Messung des Aktivatorgehalts wurden die den Aktivator enthaltenden Fraktionen mit 0,1 mg Cytochrom C/ml versetzt, gegen dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

6.2.4.5. Präparative Elektrophorese

Die präparative Elektrophorese wurde in einem dem Gerät der Fa. Desaga (Nr. 14 62 00, Desaga, Heidelberg) analogen, aber größer dimensionierten Gerät aus der Institutswerkstatt durchgeführt. (Dimensionen des Innenraums des Kühlblocks nach Einlegen der Glasplatten : 16 cm hoch, 16 cm breit, 0,5 cm tief.) Als Puffersystem diente das diskontinuierliche System von Williams und Reisfeld (1964) (genaue Beschreibung in Abschn. 6.2.7.).

Zunächst wurde in die Kammer etwa 12 cm hoch ein 5 %iges Trenngel einpolymerisiert, darüber dann das 3,1 % ige Sammelgel. In diesem waren nebeneinander durch Einsetzen entsprechender Kunststoffblöcke zwei Taschen ausgespart worden, und zwar eine etwa 13 cm breite Haupttasche und eine 1 cm breite Seitentasche.

Das in 5 ml des Sammelgelpuffers aufgenommene Lyophilisat der Aktivatorfraktionen wurde mit 0,5 ml einer Lösung von 0,01 % Bromphenolblau in Glycerin versetzt. Etwa 1 nMol

tritiummarkiertes Glykolipid G_{A2} (200 000 cpm) wurde aus organischer Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (3810, Eppendorf, Hamburg) eingetrocknet, mit 50 μ l Wasser versetzt und ultrabeschallt, dann wurden 50 μ l der vorbereiteten Aktivatorlösung zugegeben und die Mischung in die kleine Tasche des Sammelgels beladen. Die Hauptmenge der Aktivator-Lösung wurde in die große Tasche gegeben. Die Elektrophorese wurde zunächst etwa 15 Min. lang mit einer Stromstärke von 50 mA, dann bis zur Beendigung (Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem unteren Ende des Trenngels) mit 100 mA gefahren ($12,5 \text{ mA/cm}^2$). Nach dem Lauf wurde der Seitenstreifen mit der Aktivator/ G_{A2} -Mischung abgetrennt und zur Lokalisierung der Aktivatorbande in Segmente von $1/3 \text{ cm}$ Länge zerteilt. Jedes Segment wurde zerkleinert, in ein Zählgläschen überführt, mit 10 ml Szintillator-Lösung versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. (Zwar wird bei dieser Methode zunächst nur ein geringer Teil (weniger als 10 %) des Lipids aus dem Gel extrahiert und damit der Radioaktivitätsmessung zugänglich, diese anfängliche Zählausebeute ist aber für alle Fraktionen gleich schlecht, deswegen läßt sich der Peak bereits bei der ersten Zählung genau lokalisieren. Eine solch schnelle Messung ist nötig, um der Diffusion der Aktivatorbande im Hauptgel zu begegnen.)

Die so bestimmte Wanderungsstrecke des Aktivators wurde auf das Hauptgel übertragen. Das entsprechende Segment des Hauptgels wurde ausgeschnitten und durch isoelektrische Fokussierung (s.u.) extrahiert.

6.2.4.6. Präparative isoelektrische Fokussierung

Die Extraktion des Polyacrylamidgels durch präparative Elektrofokussierung wurde in einem granulierten Flachgel (Sephadex G-75) in einem entsprechenden Gerät der Fa. LKB (Schweden) durchgeführt:

Etwa 5 ml eines käuflichen Präparats von Trägerampholyten ("Ampholine", LKB, Schweden) für den pH-Bereich 4 - 6 wurden mit 105 ml dest. Wasser gemischt. 5 g mit dest. Wasser und Äthanol gewaschenes, gut getrocknetes Sephadex G-75 wurden in 100 ml der Ampholine-Lösung eingerührt und gequollen. An die Schmalseiten einer exakt waagerecht ausgerichteten, von einem 0,5 cm hohen, aufgeklebten Kunststoffrand begrenzten

Glasplatte (25 cm x 11 cm) wurden zunächst die mit der restlichen Ampholine-Lösung getränkten Elektrodenpapierstreifen plaziert, dann wurde die Gelsuspension auf die Platte gegossen und sorgfältig verteilt. Der den Aktivator enthaltende Polyacrylamidgel-Streifen wurde halbiert und parallel zu den Elektrodenstreifen und möglichst nahe zu diesen in die Suspension eingelegt. Nach mehrstündigem Antrocknen (zur Verfestigung des Sephadex-Gels) wurde auf die Kathode ein mit 1 M NaOH getränkter Papierstreifen aufgelegt, auf die Anode ein Streifen mit 1 M H_3PO_4 . Die Glasplatte wurde auf den Kühlblock des Gerätes übertragen, dann wurde eine Spannung von 500 V (mit einer Stromstärkenbegrenzung auf 17 mA und einer Leistungsbegrenzung auf 8 W, Spannungsgerät der Fa. LKB, Schweden) angelegt und 20 Std. lang unter Wasserkühlung fokussiert.

Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Gel mittels eines Fraktioniergitters in Längsrichtung in 30 Fraktionen zerteilt und in jeder Fraktion der pH-Wert gemessen (Oberflächenelektroden-Kombination Nr 374 M8 und Lot 273 M2 der Fa. Ingold, Frankfurt/Main). Die Fraktionen mit pH-Werten zwischen 4,3 und 5,3 wurden einzeln in kleine Säulen transferiert und mit je 5 ml 40 mM Citratpuffer, pH 4,2, eluiert. In den Eluatzen wurde lediglich der Aktivatorgehalt gemessen, der Proteingehalt konnte nicht bestimmt werden, da die Trägerampholyten sich in den entsprechenden Tests wie Proteine verhalten.

6.2.4.7. Hydrophobe Chromatographie

In eine Pasteur-Pipette wurde etwa 1 ml Octyl-Sepharose 4 B (Pharmacia, Schweden) gepackt und mit dest. Wasser gründlich gewaschen. Die Säule wurde mit den vereinten Aktivatorfraktionen der isoelektrischen Fokussierung beladen, dann mit 10 ml 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, gewaschen und anschließend mit 2% Natriumcholat im selben Puffer (5 ml) eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Elutionsfraktionen wurden einzeln gegen dest. Wasser dialysiert, dann wurden Protein und Aktivatorgehalt gemessen.

6.2.5. Protein-Messung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt: 0,1 ml der zu messenden Lösung wurden mit 0,5 ml einer Lösung von 20 g Natriumkarbonat, 4 g NaOH, 0,2 g Natriumtartrat und 0,1 g CuSO_4 in 1 l Wasser versetzt. Nach 10 Min. wurden 50 μl Folin-Ciocalteus Phenolreagens (Merck, 1:1 mit Wasser verdünnt) zugegeben. Nach weiteren 30 Min. wurde die Extinktion der Lösung bei 540 nm in 1 cm-Glasküvetten gemessen. Als Referenz diente kristallines Rinderserumalbumin.

6.2.6. Charakterisierung des Aktivators

6.2.6.1. Proteolytischer Abbau

50 μl einer Aktivator-Lösung (nach Gelfiltration, etwa 25 AE) wurden in 100 μl 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,5, gegeben, dazu wurden 0,1 mg Pronase P (Serva, Mannheim), suspendiert in 10 μl Wasser, zugefügt. Nach 5 Std. Inkubation bei 37°C wurden weitere 0,2 mg Protease zugegeben und nach weiteren 15 Std. noch einmal 0,2 mg. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 30 Std. wurde der Ansatz in ein Eisbad überführt. Aliquote von 10 μl wurden auf ihre Fähigkeit, den enzymatischen Abbau des Gangliosids $\text{G}_{\text{M}2}$ zu stimulieren, geprüft.

Als Kontrolle diente ein Ansatz, der ebenfalls 50 μl Aktivator-Lösung in 100 μl des Phosphatpuffers enthielt und der parallel zum anderen bei 37°C inkubiert wurde, dem jedoch erst nach dieser Inkubation, im Eisbad, 0,5 mg Pronase P zugefügt wurden.

6.2.6.2. Hitzestabilität

Je 1 ml eines rohen Nierenextraktes wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (3810, Eppendorf, Hamburg) im Wasserbad für 1 Std. auf eine der angegebenen Temperaturen (40 - 90°C) erhitzt, dann zentrifugiert (3 Min, Tischzentr., Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde mit synthetischem Substrat auf Hexosaminidase-Aktivität und im enzymatischen Test mit Gangliosid $\text{G}_{\text{M}2}$ auf Aktivatorgehalt geprüft. Als Referenz diente eine in der Zwischenzeit auf Eis aufbewahrte Probe.

6.2.6.3. Molekulargewichtsbestimmung

Eine Sephadex G-100-Säule (25 mm x 600mm) wurde mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, mit 0,15 M NaCl ("PBS") äquilibriert. Zur Eichung wurde zunächst eine Lösung von 2 mg Dextranblau 2000, 1 mg Cytochrom C, 2 mg Chymotrypsinogen, 2 mg Ovalbumin und 0,2 mg tritiummarkiertes Leucin (etwa 300 000 cpm) in 2 ml 10 % Saccharose-Lösung mit einer Durchflußrate von 1 ml/Min. (12 cm/hr) mit PBS über diese Säule chromatographiert.

Zur eigentlichen Molekulargewichtsbestimmung wurde eine Lösung von 220 AE des Aktivators, 2 mg Dextranblau 2 000, 1 mg Cytochrom C und 0,2 mg ^3H -Leucin in 2 ml 10 % Saccharose-Lösung unter den selben Bedingungen chromatographiert. Fraktionen von 5 ml wurden in beiden Fällen gesammelt. Das Dextranblau wurde anhand seiner Extinktion bei 620 nm (1 cm-Küvette), das Cytochrom C anhand der Extinktion bei 400 nm gemessen. Leucin konnte anhand seiner Radioaktivität quantifiziert werden, der Aktivatorgehalt wurde im enzymatischen Test mit Gangliosid $\text{G}_{\text{M}2}$ bestimmt (Abschn. 6.2.2.4.). Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) gemessen.

Der Gipfel des Dextranblaus markiert das Ausschlußvolumen (v_o), der des Leucins das Salzvolumen (v_t). Trägt man den für jedes Eichprotein ermittelten Wert

$$K_{AV} = \frac{v_s - v_o}{v_t - v_o}$$

(v_s = Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins) gegen den Logarithmus des Molekulargewichts auf, so erhält man näherungsweise eine Gerade, anhand derer sich aus dem K_{AV} -Wert des Aktivators dessen Molekulargewicht ermitteln läßt.

6.2.7. Analytische Elektrophoresen

Die analytischen Elektrophoresen wurden in der Flachgel-Elektrophorese-Apparatur der Fa. Desaga (Nr 14 62 00, Fa. Desaga, Heidelberg) durchgeführt. Zur Erzielung scharfer Banden wurden diskontinuierliche Gel-Systeme verwendet (Maurer, 1971).

a) neutrales System (Williams und Reisfeld, 1964):

Trenngel: 5 g Acrylamid, 0,13 g Methylen-N,N'-bisacrylamid (Bis), und 0,07 g Ammoniumpersulfat in 100 ml 7 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5.

Sammelgel: 2,5 g Acrylamid, 0,63 g Bis, 20 g Saccharose und 0,5 mg Riboflavin in 5 mM Tris-Phosphorsäure-Puffer, pH 5,5,

Elektrodenpuffer: 8,3 mM Tris, 30 mM 5,5-Diäthylbarbitursäure, pH 7,0.

Zur Markierung der Front wurden die Proben vor dem Auftragen mit 0,001 % Bromphenolblau versetzt.

b) saures System (Reisfeld et al., 1962):

Trenngel: 5 g Acrylamid, 0,13 g Bis, 0,14 g Ammoniumpersulfat in 100 ml 380 mM Kaliumacetatpuffer, pH 4,3,

Sammelgel: 2,5 g Acrylamid, 0,63 g Bis und 0,5 mg Riboflavin in 100 ml 63 mM Kaliumacetatpuffer, pH 6,7,

Elektrodenpuffer: 14 mM Essigsäure, 20 mM β -Alanin, pH 4,2.

Zur Markierung der Front diente in diesem System Methyleneblau (0,005 % in der Probe).

Alle analytischen Elektrophoresen wurden unter Wasserkühlung mit einer Stromstärke von 45 mA (20 mA/cm^2) durchgeführt, bis der jeweilige Markerfarbstoff das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

Färbung der Gele:

Zur Färbung auf Protein wurden die Gele nach dem Lauf für 1 Std. in 12,5 % Trichloressigsäure bei Raumtemperatur fixiert, dann für 2 Std. in einer frisch bereiteten Suspension von 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in 12 %iger Trichloressigsäure gefärbt. Bei dieser Methode ist nach Angabe der Autoren (Chrambach et al., 1967) ein Entfärben nicht nötig, es stellte sich jedoch als zweckmäßig heraus, die Gele vor der photographischen Dokumentation 1 - 2 Tage in 7 % Essigsäure zu lagern.

Messung der Radioaktivität in den Gelen:

Die entsprechenden Bahnen wurden in kleine Abschnitte zerteilt. Jeder dieser Abschnitte wurde zerkleinert, für 1 Std. mit 1 ml "tissue solubilizer" (TS-1, Fa. Koch-Light, England) auf 60°C erhitzt und anschließend mit 60 μl einer 4 %igen Ascorbinsäurelösung versetzt. Nach weiterem 1-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Radioaktivität gemessen.

Elution des Aktivators aus den Gelen:

Die Gele wurden in kleine Abschnitte zerteilt, jeder Abschnitt wurde zerkleinert und für 3 Tage mit 1 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 4,2, bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (3 Min., Eppendorf-Tisch-Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg) und Aliquote der Überstände auf ihren Aktivatorgehalt geprüft.

6.2.8. Isoelektrische Fokussierung im Dichtegradienten

Die isoelektrische Fokussierung im Dichtegradienten wurde in einer "Mini-Säule" nach Harzer (1970) durchgeführt:

Ein Schenkel der U-Rohr-förmigen Anordnung enthielt 15 ml Kathodenlösung (50 g Saccharose und 1,5 ml Äthylen-diamin pro 100 ml Lösung), der andere wurde mit einem Dichtegradienten aus 7 ml 35 %iger Saccharose-Lösung und 7 ml der (gegen 1%ige Glycin-Lösung dialysierten) Probe, beide mit 4 % Ampholin des pH-Bereichs 3 - 10, gefüllt und mit 2 ml 0,1 %iger H_2SO_4 überschichtet (Anodenlösung).

Als Probe wurden 2 ml einer teilgereinigten Aktivator-Präparation (nach der DEAE-Zellulose-Säule), mit 5 ml Wasser verdünnt, eingesetzt. Nach der Fokussierung (etwa 20 Std. bei einer Spannung von 1000 Volt) wurde der Probenraum vom Kathodenraum getrennt und vorsichtig ausgelassen (über eine eingeschmolzene Kapillare) und in 0,5 ml-Portionen fraktioniert. In jeder Fraktion wurde mit einer 65 μ l-Mikro-pH-Elektrode (Fa. Radiometer, Kopenhagen) der pH-Wert bestimmt, sowie an Aliquoten im enzymatischen Test der Aktivatorgehalt gemessen.

6.2.9. Messung der kritischen Mizellkonzentrationen

Die kritischen Mizellkonzentrationen wurden nach der Methode von Becher (1962) bestimmt:

In 500 ml des jeweils gewählten Puffers wurden 10 mg Rhodamin 6 G (E.Merck, Darmstadt) gelöst. In dieser Farbstofflösung wurden dann die betreffenden Detergentien in unterschiedlicher Konzentration gelöst und die Differenz der Extinktionen bei 550 nm zwischen detergenschaltiger und detergensfreier Lösung gemessen (Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke). Zur Auswertung wurden die Extinktionsdifferenzen gegen den Logarithmus der Detergensenkonzentration aufgetragen. Im

Bereich der kritischen Mizellkonzentration ergab sich dabei ein scharfer Anstieg der Extinktion.

6.2.10. Zellzüchtung

Menschliche Hautfibroblasten normalen und pathologischen Ursprungs wurden in "Eagle's modified medium" (Gibco, Grand Island, New York, USA; Kat.-Nr H-16) unter Zusatz von 10 - 20 % fetalen Kälberserums (LS Laborservice, München) und 1,5 - 2 g NaHCO_3 /l unter einer Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt. Nach 6 - 8 Wochen (4 Subkulturen) wurden die - konfluenten - Zellen mit 0,85 % NaCl in doppelt destilliertem Wasser gespült und mit einem Gummi-Schaber von der Unterlage abgeschabt und abzentrifugiert. Die Pellets wurden bis zur Verwendung bei -70°C tiefgefroren gelagert.

7. Literatur

- Aghion, A. (1934) Thèse, Universität Paris.
- Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91, 222 - 233
- Bach, G. und Suzuki, K. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1328 - 1332
- Baraton, G. und Revol, A. (1977) Clin. Chim. Acta 76, 339 - 343
- Becher, P. (1962) J. Phys. Chem. 66, 374
- Bernheimer, H. und Seitelberger, F. (1968) Wiener Klin. Wochenschr. 80, 163 - 164
- Besançon, F. und Ankel, H. (1974) Nature 252, 478 - 480
- Besançon, F., Ankel, H. und Basu, S. (1976) Nature 259, 576 - 578
- Beutler, E., Yoshida, A., Kuhl, W. und Lee, J.E.S. (1976) Biochem. J. 159, 541 - 543
- Brett, E.M., Ellis, R.B., Haas, L., Ikonne, J.U., Lake, B.D., Patrick, A.D. und Stephens, R. (1973) Arch. Dis. Childh. 48, 775 - 785
- Carroll, M. und Robinson, D. (1973) Biochem. J. 131, 91 - 96
- Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wyckoff, M. und Zaccari, J. (1967) Anal. Biochem. 20, 150
- Conzelmann, E. (1976) Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Conzelmann, E., Sandhoff, K., Nehr Korn, H., Geiger, B. und Arnon, R. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 27 - 33
- Cuatrecasas, P. und Anfinsen, J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059
- Cumar, F.A., Maggio, B. und Caputto, R. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 65 - 69
- de Baecque, C.M., Suzuki, K., Rapin, I., Johnson, A.B., Whethers, D.L. und Suzuki, K. (1975) Acta Neuropathol. 33, 207 - 226
- Deijter-Juszynski, M., Harpaz, N., Flowers, H.M. und Sharon, N. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 363 - 373
- Fendler, E.J. und Fendler, J.H. (1970) Adv. Phys. Org. Chem. 8, 271 - 406
- Findlay, J., Levvy, G.A. und Marsh, C.A. (1958) Biochem. J. 69, 467 - 476
- Fischer, G. und Jatzkewitz, H. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 605 - 613

- Fischer, G. (1977) Dissertation, Universität Stuttgart.
- Fischer, G. und Jatzkewitz, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 528, 69 - 76
- Fishman, P. und Brady, R.O. (1976) *Science* 194, 906 - 915
- Formisano, S., Johnson, M.L., Lee, G., Aloj, S.M. und Edelhoch, H. (1979) *Biochemistry* 18, 1119 - 1124
- Frohwein, Y.Z. und Gatt, S. (1967) *Biochemistry* 6, 2783 - 2787
- Gammack, D.B. (1963) *Biochem.J.* 88, 373 - 383
- Gatt, S. und Barenholz, Y. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42, 61 - 90
- Gatt, S., Dinur, T. und Kopolovic, J. (1978) *J. Neurochem.* 31, 547 - 550
- Gazzotti, P. und Peterson, S.W. (1977) *J. Bioenerget. Biomembr.* 9, 373 - 386
- Geiger, B., Navon, R., Ben-Yoseph, Y. und Arnon, R. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 311 - 318
- Geiger, B. und Arnon, R. (1976) *Biochemistry* 15, 3484 - 3492
- Ghidoni, R., Sonnino, S. und Tettamanti, G. (1978) *Lipids* 13, 820 - 822
- Goldman, R. (1976) in "Lysosomes in Biology and Pathology", hrsg. von J.T. Dingle und R.T. Dean, Band 5, pp 309 - 336. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Hakomori, S.-I. (1965) in "The Aminosugars", hrsg. von E.A. Balasz und R.W. Jeanloz, Band II-A, pp 353 - 379. Academic Press, New York.
- Hakomori, S.-I. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 417, 55 - 89
- Harzer, K. (1970) *Z. Anal. Chem.* 252, 170 - 174
- Hechtman, P. und Le Blanc, D. (1977) *Biochem. J.* 167, 693 - 701
- Helenius, A. und Simons, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29 - 79
- Ho, M.W. und O'Brien, J.S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2810 - 2813
- Ho, M.W. (1975) *FEBS Lett.* 53, 243 - 247
- Holmgren, J. (1973) *Infect. Immunol.* 8, 851
- Holmgren, J., Lönnroth, I. und Svennerholm, L. (1973) *Scand. J. Infect. Dis.* 5, 77 - 78
- Huang, T.C. (1978) *Nature* 276, 624 - 626
- Jatzkewitz, H. und Stinshoff, K. (1973) *FEBS Lett.* 32, 129 - 131
- Kamp, H.H., Wirtz, K.W.A. und Van Deenen, L.L.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 318, 313 - 325

- King, C.A. und van Heyningen, W.E. (1973) J. Infect. Dis. 127, 639 - 647
- Klenk, E. (1939) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 262, 128 - 143
- Klenk, E. (1941a) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 267, 128 - 144
- Klenk, E. (1941b) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 268, 50
- Klenk, E. und Langerbeins, H. (1941) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 270, 185
- Klenk, E. (1942a) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 273, 76 - 86
- Klenk, E. (1942b) Ber. Dt. Chem. Ges. 75, 1632
- Klenk, E. und Rennkamp, F. (1942) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 273, 253 - 268
- Klenk, E., Liedtke, U. und Gielen, W. (1963) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 334, 186 - 192
- Koschine, H. (1977) Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kushner, L.M. und Hubbard, W.D. (1954) J. Phys. Chem. 58, 1163 - 1167
- Kuwata, T., Handa, S., Fuse, A. und Morinaga, N. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 77 - 84
- Landa, C.A., Maccioni, H.J.F., Arce, A. und Caputto, R. (1977) Biochem. J. 168, 325 - 332
- Leaback, J. und Walker, F. (1961) Biochem. J. 78, 151 - 157
- Ledeen, R.W. und Yu, R.K. (1973) in "Lysosomes and Storage Diseases", herseg. von H.G. Hers und F. van Hoof, pp. 129 - 139. Academic Press, New York.
- Li, Y.T., Mazzotta, M.Y., Wan, C.C., Orth, R. und Li, S.C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7512 - 7515
- Li, Y.T. und Li, S.C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1159 - 1163
- Lineweaver, H. und Burk, D. (1934) J. Am. Chem. Soc. 56, 658 - 666
- Lloyd, J.B. (1969) Biochem. J. 115, 703 - 707
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- Maurer, H.R. (1971) "Disk Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis". Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York.
- Mehl, E. und Jatzkewitz, H. (1964) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 260 - 274
- Michaelis, L. und Menten, E. (1913) Biochem. Z. 49, 333

- Mraz, W., Fischer, G. und Jatzkewitz, H. (1976) FEBS Lett. 67, 104 - 109
- Mullin, B.R., Fishman, P.H., Lee, G., Aloj, S.M., Ledley, F.D., Winand, R.J., Kohn, L.D. und Brady, R.O. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 842 - 846
- Neufeld, E.F., Lim, L. und Shapiro, L.J. (1975) Ann. Rev. Biochem. 44, 357 - 376
- Nomoto, M., Narahashi, Y. und Murakami, M. (1960) J. Biochem. 48, 593
- Novikoff, A.B. (1973) in "Lysosomes and Storage Diseases", hrsg. von H.G. Hers und F. van Hoof, pp. 2 - 41. Academic Press, New York.
- O'Brien, J.S., Okada, S., Chen, A. und Fillerup, D.L. (1970) New Engl. J. Med. 283, 15 - 20
- O'Brien, J.S. (1973) in "Lysosomes and Storage Diseases", hrsg. von H.G. Hers und F. van Hoof, pp. 323 - 344. Academic Press, New York.
- O'Brien, J.S., Norden, A.G.W., Miller, A.L., Frost, R.G. und Kelly, T.E. (1977) Clin. Genet. 11, 171 - 183
- Ohkuma, S. und Poole, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3327 - 3331
- Okada, S. und O'Brien, J.S. (1969) Science 165, 698 - 700
- Radin, N.S. (1972) in "Methods in Enzymology", Band 28 B, pp. 300 - 306. Hrsg. von S.P. Colowick und N.O. Kaplan. Academic Press, New York.
- Rapin, I., Suzuki, K., Suzuki, K. und Valsamis, M.P. (1976) Arch. Neurology 33, 120 - 130
- Reijngoud, D.J. und Tager, J.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 472, 419 - 449
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. und Williams, D.E. (1962) Nature 195, 281 - 283
- Renkonen, O., Gahmberg, C.G., Simons, K. und Kaariainen, L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 66 - 78
- Richardson, C.L., Baker, S.R., Morr , D.J. und Keenan, T.W. (1975) Biochim. Biophys. Acta 417, 175 - 186
- Robinson, D. und Stirling, J.L. (1968) Biochem. J. 107, 321
- Roseman, S. (1970) Chem. Phys. Lipids 5, 270 - 297
- Samuels, S., Korey, S.R., Gonatas, J., Terry, R.D. und Weiss, M. (1963) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22, 81 - 97

- Sandermann, H. jr. (1978) Biochim. Biophys. Acta 515, 209 - 237
- Sandhoff, K. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1095 - 1098
- Sandhoff, K., Andrae, U. und Jatzkewitz, H. (1968) Pathol. Eur. 3, 278 - 285
- Sandhoff, K. (1969) FEBS Lett. 4, 351 - 354
- Sandhoff, K. (1970) FEBS Lett. 11, 342 - 344
- Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W. und Jatzkewitz, H. (1971) J. Neurochem. 18, 2469 - 2489
- Sandhoff, K. und Harzer, K. (1973) in "Lysosomes and Storage Diseases", pp. 345 - 356. Hrsg. von H.G. Hers und F. van Hoof. Academic Press, New York.
- Sandhoff, K. (1977) Angew. Chem. 89, 283 - 295
- Sandhoff, K., Conzelmann, E. und Nehrke, H. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 779 - 787
- Sandhoff, K. und Pallmann, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 122 - 126
- Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Yoshida, A. und Beutler, E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2043 - 2048
- Stryer, L. (1975) "Biochemistry". W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Stevens, R.L., Fluharty, A.L., Kihara, H., Kaback, M.M., Shapiro, L.I., Sandhoff, K. und Fischer, G. (1979) Clin. Res. 27, A 104 (Meeting abstract)
- Suzuki, Y. und Suzuki, K. (1972) J. Lipid Res. 13, 687 - 690
- Suzuki, K. (1979) in "Structure and Function of Gangliosides", hrsg. von P. Mandel, L. Svennerholm, P.F. Urban und H. Dreyfus. Plenum Publishing Co., New York, im Druck.
- Svennerholm, L. (1963) J. Neurochem. 10, 613 - 623
- Svennerholm, L. (1972) in "Methods in Carbohydrate Research", pp. 464 - 474. Hrsg. von R.L. Whistler und J.N. Bemiller. Academic Press, New York.
- Svennerholm, L. (1976) in "Les Colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", Band 61, pp. 141 - 153. Hrsg. von A. Boué.
- Tallman, J.F. und Brady, R.O. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7570 - 7575
- Tanford, C. (1973) "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes". John Wiley & Sons, New York.

- Tay, W. (1881) Trans. Ophthalm. Soc. UK 1, 55 - 57
- Terry, R.D. und Weiss, M. (1963) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22, 18 - 55
- Vaes, G. (1973) in "Lysosomes and Storage Diseases", pp. 43 - 77.
Hrsg. von H.G. Hers und F. van Hoof. Academic Press,
New York.
- Van Heyningen, W.E. (1976) FEBS Lett. 68, 5 - 7
- Vengris, V.E., Reynolds, F.H.jr., Hollenberg, M.D. und Pitha, P.M. (1976) Virology 72, 486 - 493
- Volk, B.W. und Schneck, L. (1975) "The Gangliosidoses". Plenum Press, New York.
- Williams, D.E. und Reisfeld, R.A. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 373 - 381
- Yamakawa, T. (1966) in "Lipoide. 16. Colloquium der Gesellschaft Physiol. Chem., Mosbach", pp 87ff. Hrsg. von E.Schütte. Springer-Verlag, Berlin.
- Yamakawa, T. und Nagai, Y. (1978) Trends in Biochem. Sci. 3, 128 - 131
- Young, E.P., Ellis, R.B., Lake, B.D. und Patrick, A.D. (1970) FEBS Lett. 9, 1 - 4
- Zerfowski, J. und Sandhoff, K. (1974) Acta Neuropath. (Berlin) 27, 225 - 232

8. Anhang - Ableitung der verwendeten Gleichungen

8.1. Gleichungen für die Zeitabhängigkeit der Produktbildung bei gleichzeitiger Inaktivierung des Enzyms

Nach der enzymkinetischen Theorie von Michaelis und Menten (1913) ist die Umsatzrate

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

wobei $[P]$ die Produktkonzentration, $[S]$ die Substratkonzentration, K_M die Michaelis-Konstante und $v_{\max}$ die für totale Substratsättigung des Enzyms extrapolierte Maximalgeschwindigkeit bedeuten. (t = Zeit)

Die Maximalgeschwindigkeit ist ihrerseits das Produkt aus der theoretisch maximal möglichen Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex (nämlich der gesamten Enzymkonzentration $[E]$) und der geschwindigkeitskonstante für die Weiterreaktion des Komplexes zu Enzym und Produkt, k_3 :

$$v_{\max} = [E] \cdot k_3 \quad (2)$$

Nimmt nun die Konzentration an intaktem Enzym nach der Beziehung

$$[E] = [E_0] \cdot e^{-kt} \quad (3)$$

ab, ($[E]$ = Konzentration an intaktem Enzym zur Zeit t , $[E_0]$ = Anfangskonzentration des Enzyms, k = Zeitkonstante der Inaktivierung ($k = \ln 2 / \text{Halbwertszeit}$)), so wird auch die Umsatzrate entsprechend zeitabhängig:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} e^{-kt} \quad (4)$$

(v ist dabei die zur Zeit t herrschende Umsatzgeschwindigkeit, $v_{\max}$ dagegen die Maximalgeschwindigkeit bei der anfänglichen Enzymkonzentration, also gleich $[E_0] \cdot k_3$.)

Berücksichtigt man die durch Verringerung der Substratkonzentration zusätzlich verursachte Verlangsamung der Reaktion, so wird die zur Zeit t vorliegende Substratkonzentration

$$[S] = [S_0] - [P] \quad (5)$$

und damit

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \frac{[S_0] - [P]}{K_M + [S_0] - [P]} e^{-kt} \quad (6)$$

Nach Separation der Variablen erhält man die Differentialgleichung

$$\left(\frac{K_M + [S_0] - [P]}{[S_0] - [P]} \right) d[P] = v_{\max} \cdot e^{-kt} \cdot dt \quad (7)$$

Die Integration dieser Gleichung mit den Randbedingungen $[P] = 0$ für $t = 0$ und $[P] = [P_1]$ bei $t = t_1$ liefert

$$-K_M \int_{P=0}^{P=P_1} \frac{d[P]}{[P] - [S_0]} + \int_{P=0}^{P=P_1} d[P] = v_{\max} \int_{t=0}^{t=t_1} e^{-kt} dt \quad (8)$$

(Der in der Klammer von Gleichung (7) stehende Ausdruck wurde dabei in zwei Summanden zerlegt und beide getrennt integriert.)
Damit wird

$$[P_1] - K_M \ln \frac{[S_0] - [P]}{[S_0]} = \frac{v_{\max}}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (9)$$

und da die Substratkonzentration zur Zeit t_1

$$[S_1] = [S_0] - [P_1] \quad \text{ist} \quad (10)$$

wird

$$[S_0] - [S_1] - K_M \ln \frac{[S_1]}{[S_0]} = \frac{v_{\max}}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (11)$$

Zu einer wesentlich einfacheren Beziehung gelangt man, wenn man den Einfluß der Änderung der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit vernachlässigt, was bei geringen Abbauraten ($[S] \approx \text{const.}$), vor allem, wenn $[S] \gg K_M$ ist, nur einen geringen Fehler verursacht. Man kann dann direkt aus Gleichung (4) die Variablen separieren :

$$d[P] = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} e^{-kt} dt \quad (12)$$

($[S]$ wird nunmehr ja als Konstante betrachtet)

Die Integration in den bereits erwähnten Grenzen $[P] = 0$ bei $t = 0$ und $[P] = [P_1]$ bei $t = t_1$:

$$d[P] = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} e^{-kt} dt \quad (13)$$

ergibt dann

$$[P_1] = \frac{v_{\max}}{k} \frac{[S]}{K_M + [S]} (1 - e^{-kt}) \quad (14)$$

8.2. Gleichungen für die Kinetik des enzymatischen Lipid- Abbaus in Gegenwart des Aktivatorproteins

Das von Fischer und Jatzkewitz vorgeschlagenen Modell zur Stimulierung des enzymatischen Lipidabbaus durch ein Aktivatorprotein (Fischer und Jatzkewitz, 1978) geht davon aus, daß zunächst der Aktivator mit dem Lipid einen Komplex im Verhältnis 1:1 bildet, der das eigentliche Substrat für die Enzymreaktion darstellt. In die Michaelis-Menten-Gleichung (s. Abschn. 8.1., Gleichung (1)) ist dann statt der Substratkonzentration $[S]$ die Konzentration an Aktivator-Substrat-Komplex $[AS]$ einzusetzen:

$$v = v_{\max} \frac{[AS]}{K_M + [AS]} \quad (15)$$

Die Michaelis-Konstante K_M gilt dabei für die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Aktivator-Substrat-Komplex, nicht etwa für die direkte Wechselwirkung Enzym/Lipid, welche bei dieser Betrachtung vernachlässigt wird.

Setzt man für die Wechselwirkung zwischen Aktivator und Lipid die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes voraus, so gilt

$$\frac{([A] - [AS])([S] - [AS])}{[AS]} = K_S \quad (16)$$

($[A]$ = Gesamtkonzentration des Aktivators, $[S]$ = Gesamtkonzentration des Substrats, K_S = Dissoziationskonstante).

Die Auflösung dieser Gleichung nach $[AS]$ führt allerdings zu einer quadratischen Gleichung, deren allgemeine Lösung, in die Michaelis-Menten-Gleichung eingesetzt, einen sehr komplexen Ausdruck ergäbe, was der angestrebten Möglichkeit einer einfachen graphischen Auswertung im Wege stünde. Eine wesentliche Vereinfachung ergibt sich unter der Annahme, daß die Substrat-Konzentration die Aktivator-Konzentration bei weitem übersteigt, so daß die Abnahme der Konzentration an ungebundenem Substrat durch die Bildung des Komplexes vernachlässigt werden kann.:

Ist $[S] \gg [A]$, so vereinfacht sich Gleichung (16) zu

$$\frac{([A] - [AS])[S]}{[AS]} = K_S \quad (17)$$

oder umgeformt

$$[AS] = \frac{[A][S]}{K_S + [S]} \quad (17a)$$

Setzt man den rechten Bruch für $[AS]$ in die Michaelis-Menten-Gleichung ein, so erhält man den verhältnismäßig einfachen Ausdruck

$$v = v_{\max} \frac{[A][S]}{(K_S + [S])K_M + [A][S]} \quad (18)$$

Die meistens verwendete graphische Auswertungsmethode zur Ermittlung enzymkinetischer Parameter aus den Meßdaten, die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk (1934), führt aufgrund der durch Stürzen der Gleichung (18) und einiges Kürzen erhaltenen Beziehung

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \left(\frac{K_S \cdot K_M}{[A][S]} + \frac{K_M}{[A]} + 1 \right) \quad (19)$$

zu folgenden Resultaten:

a) Variation der Aktivatorkonzentration bei konstanter Substratkonzentration:

Trägt man $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[A]}$ auf, so erhält man (solange $[S] \gg [A]$) eine Gerade, die die x-Achse bei

$$x = - \frac{[S]}{(K_S + [S])K_M}$$

und die y-Achse bei

$$y = \frac{1}{v_{\max}}$$

schneidet.

Wenn $[S] \gg K_S$ ist, also bei sehr niedriger Dissoziationskonstante K_S oder hoher Substrat-Konzentration $[S]$, liegt der x-Achsenabschnitt in guter Näherung bei

$$x = - \frac{1}{K_M}$$

(Dies folgt auch einfach aus der Tatsache, daß unter diesen Bedingungen der Aktivator stets mit Substrat so gut wie gesättigt ist, also $[AS] = [A]$.)

b) Variation der Substrat-Konzentration bei konstanter Aktivator-Konzentration:

Auch in diesem Fall gibt die doppelt reziproke Darstellung ($\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[S]}$) für $[S] \gg [A]$ in sehr guter Näherung eine Gerade, wie sich durch eine Umstellung von Gleichung (19) leicht zeigen läßt:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[S]} \frac{K_S \cdot K_M}{[A] v_{\max}} + \frac{K_M}{[A] v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (19a)$$

Diese Gerade schneidet die x-Achse bei

$$x = - \frac{K_M + [A]}{K_S K_M}$$

und die y-Achse bei

$$y = \frac{1}{v_{\max}} \left(\frac{K_M}{[A]} + 1 \right) .$$

9. Zusammenfassung

Der Abbau der Glykosphingolipide G_{M2} und G_{A2} durch die Hexosaminidasen erfolgt in vitro nur sehr langsam, da die von den Lipiden in wässriger Lösung gebildeten Mizellen für die - wasserlöslichen - Enzyme kaum zugänglich sind. Durch den Einsatz von Gallensalzen kann dieser Abbau sehr stark stimuliert werden. In dieser Arbeit beschriebene Untersuchungen zum Mechanismus dieser Aktivierung führten zu folgenden Resultaten:

Alle eingesetzten Gallensalze aktivierten den Gangliosid-Abbau erst oberhalb ihrer jeweiligen kritischen Mizellkonzentration. Nichtionische Detergentien von Polyätherphenol-Typ (Triton) erwiesen sich als wirkungslos.

Der Abbau eines wasserlöslichen Substrats (4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminid) wurde durch die Detergentien nicht stimuliert.

Das Enzymprotein selbst wurde durch die Gallensalze nicht aktiviert, sondern während der Inkubationsdauer langsam denaturiert.

Im Zusammenhang mit den bereits bekannten Eigenschaften der Gallensalze sprechen diese Ergebnisse für folgenden Mechanismus der Stimulierung: Oberhalb ihrer kritischen Mizellkonzentration bilden die Gallensalze Mischmizellen mit den Glykolipiden. Im Gegensatz zu den großen, kompakten Mizellen, die von den Glykosphingolipiden in Abwesenheit der Detergentien gebildet werden, ragen die Oligosaccharidketten der Glykolipide aus den relativ kleinen Mischmizellen so weit heraus, daß sie vom Enzym angegriffen werden können. Die dadurch erzielte Aktivierung des Abbaus wird jedoch begleitet von einer Inaktivierung des Enzyms. Damit hängen sowohl die experimentell ermittelte Abbaurrate als auch das Optimum der Detergengkonzentration von der gewählten Inkubationszeit ab.

Am physiologischen Ort des Glykolipidabbaus, im Lysosom, sind keine derartigen Detergentien vorhanden. Damit erhebt sich die Frage, wie dieser Abbau in vivo vermittelt wird. Für den Abbau von Sulfatiden durch Arylsulfatase A war bereits früher im Arbeitskreis von Jatzkewitz ein enzymatisch inaktives Aktivatorprotein gefunden worden. Ein ähnlicher Aktivator für den Abbau der Glykosphingolipide G_{M2} und G_{A2}

konnte in der vorliegenden Arbeit identifiziert und 2 700-fach angereichert werden.

Der Aktivator besitzt ein Molekulargewicht von 25 000 und einen isoelektrischen Punkt von pH 4,8, ist temperaturstabil bis 60°C und durch Proteasen abbaubar. Er aktiviert den Abbau der Glykolipide G_{M2} , G_{A2} und Nierenglobosid, nicht jedoch den wasserlöslicher Substrate.

Bemerkenswert ist seine Isoenzyspezifität: Der Aktivator stimuliert lediglich den Lipidabbau durch Hexosaminidase A, nicht jedoch den Umsatz durch Hexosaminidase B. Die somit von den Eigenschaften des Aktivators bestimmten Substratspezifitäten der Isoenzyme unterscheiden sich von den in Gegenwart von Detergentien gemessenen. Sie sind in der Lage, die bei Patienten der Varianten O und B der infantilen G_{M2} -Gangliosidose (einer durch Defekte der Hexosaminidasen verursachten Erbkrankheit) gefundenen Lipidspeichermuster auf der Basis der den Varianten zugrundeliegenden Isoenzym-Defekte zu erklären.

Der Mechanismus der Stimulierung entspricht dem der Aktivierung des Sulfatid-Abbaus durch den Aktivator der Arylsulfatase A: Das Aktivatorprotein bindet Lipid-Monomere und bringt diese dadurch in Lösung. Der resultierende Aktivator-Lipid-Komplex ist das eigentliche Substrat der Enzym-Reaktion. Die Bildung des Aktivator-Lipid-Komplexes konnte in elektrophoretischen Versuchen demonstriert werden. Auch wurden die nach diesem Modell theoretisch zu erwartenden Abhängigkeiten der Umsatzraten von der Aktivator- und der Lipidkonzentration tatsächlich gefunden.

Die physiologische Bedeutung des Aktivators ergibt sich aus den ebenfalls in dieser Arbeit beschriebenen Befunden bei der Variante AB der infantilen G_{M2} -Gangliosidose, einer Lipidspeicherkrankheit, für die kein Enzymdefekt nachgewiesen werden konnte:

Es konnte gezeigt werden, daß diese Krankheitsform durch den Ausfall des Aktivatorproteins für den enzymatischen Abbau der Glykolipide G_{M2} und G_{A2} verursacht wird. Bei den Patienten ist dadurch der Abbau dieser Lipidsubstrate blockiert, es kommt zur Speicherung der Lipide und zu den gleichen klinischen Konsequenzen wie bei einem Ausfall der Hexosaminidase A.

Die Diagnose von Lipidspeicherkrankheiten geschah bisher anhand der Fähigkeit von Gewebsextrakten, die in Frage stehenden Lipide in vitro in Gegenwart von Detergentien abzubauen. In vorläufigen Versuchen konnte gezeigt werden, daß wesentlich zuverlässigere Aussagen zu erwarten sind, wenn statt der Detergentien das natürliche Aktivatorprotein eingesetzt wird.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. Mai 1950 in Mühldorf/Inn als erstes Kind der Margarete Conzelmann geboren. Im Dezember 1950 wurde ich von meinen Großeltern mütterlicherseits, Heinrich und Maria Conzelmann in Tailfingen/Württ. adoptiert.

In Tailfingen besuchte ich von 1957 - 1961 die Volksschule, von 1961 - 1965 die Mittelschule. 1965 wechselte ich als Stipendiat der Ev. Landeskirche Württ. an das Ev. Kirchl. Aufbaugymnasium Michelbach/Bilz, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich zum Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München und bestand dort im Mai 1975 die mündliche Diplomprüfung. Die Diplomarbeit mit dem Thema: "Reinigung der Hexosaminidasen A und B durch Affinitätschromatographie und ihre Charakterisierung bei einem Sonderfall der infantilen amaurotischen Idiotie" fertigte ich von Juni 1975 - November 1976 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie in München an. In Weiterführung dieser Arbeit entstand bis Mai 1979 die vorliegende Dissertation.

Ich bin seit 1972 mit der japanischen Staatsangehörigen Etsuko Habe verheiratet und seit 1979 Vater einer Tochter.

